

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Diplomová práce

Klonování, exprese a charakterizace rekombinantních růstových faktorů

Cloning, expression and characterization of recombinant growth factors

Bc. Ondřej Svoboda

Praha 2008

Školitel a vedoucí diplomové práce:

RNDr. Petr Bartůněk., CSc., ÚMG AV ČR

Místo vypracování diplomové práce:

Oddělení Buněčné diferenciaci, ÚMG AV ČR

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Bartůňky., CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Praha dne: 4.9.2008

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval všem, kteří se podíleli na vzniku této diplomové práce. Především děkuji svému školiteli Dr. Petru Bartůňkovi za mnoho času, ochoty a úsilí, které věnoval vedení mé experimentální i teoretické práce. Zároveň děkuji všem členům naší skupiny za veškerou pomoc, nespočetné množství rad a konzultací (Dr. Martina Zíková, Dr. Alicia Corlett, Mgr. David Sedlák, Olga Martínková, Andre Kajlich, Mgr. Antonio Pombinho a Mgr. Eva Bartoňová).

Zároveň bych rád poděkoval všem členům skupiny Dr. Michala Dvořáka (ÚMG, AV ČR), a to především Mgr. Martě Dvořákové za pomoc spojenou s přípravou a produkcí rekombinantních proteinů v hmyzích buňkách za použití bakulovirů a Mgr. Vladimíru Čermákovi za jeho asistenci při obsluhování DNA sekvenačního přístroje. Dále děkuji Dr. Miladě Šírové (MBÚ, AV ČR) za měření inkorporace značeného thymidinu.

V neposlední řadě děkuji své rodině a Mgr. Martě Velíkové za projevenou trpělivost a podporu při psaní této diplomové práce a za její jazykovou korekci.

Tato práce vznikla v letech 2006 až 2008 v rámci grantového projektu LC06077 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Abstrakt

Klonování, exprese a charakterizace rekombinantních růstových faktorů

Růstové faktory a cytokiny jsou důležitými regulátory nejrůznějších biologických jevů, spojených s buněčnou proliferací, přežitím a diferenciací. Tato práce se zabývá především cytokinem interleukin-6 (IL-6) a jeho specifickými receptorem (IL-6R). Receptor pro IL-6 se v přírodě vyskytuje ve dvou formách, ve formě membránové a solubilní. Solubilní forma IL-6R (sIL-6R) se běžně uplatňuje při procesu zvaném transsignalizace. Během tohoto procesu dochází k extracelulární vazbě sIL-6R na IL-6. Takto vzniklý komplex (IL-6/sIL-6R) má agonistickou funkci a může se přímo vázat na buňky, exprimující další receptor IL-6 – gp130, čímž dochází k jeho aktivaci.

Fúzní protein Hyper-IL-6 se skládá z sIL-6R na N-konci, z IL-6 na C-konci, přičemž obě podjednotky jsou propojeny flexibilní linkerovou sekvencí. Jako první byl před přibližně deseti lety sestrojen lidský Hyper-IL-6. Ukázalo se, že tento protein je velmi účinným aktivátorem gp130 a je na rozdíl od IL-6/sIL-6R komplexu aktivní i při velmi nízké koncentraci. Hyper-IL-6 hraje důležitou roli jednak při studiu transsignalizace a jednak při studiu efektu aktivace gp130 u různých buněčných typů.

Cílem této diplomové práce bylo připravit molekulárně biologickými metodami první nesavčí (kuřecí) Hyper-IL-6 a paralelně připravit kuřecí IL-6 a sIL-6R. Důvodem přípravy kuřecího Hyper-IL-6 bylo mimo jiné ověření stupně konzervovanosti molekulárních mechanismů a signálních drah, pomocí kterých dochází k proliferaci či diferenciaci hematopoetických kmenových buněk a jejich prekurzorů. Hyper-IL-6 byl úspěšně exprimován v savčím expresním systému a jeho aktivita byla ověřena *in vitro*. Námi připravený Hyper-IL-6 byl plně funkční a podílel se spolu s dalšími faktory (Insulin, SCF) na terminální diferenciaci erytroidních progenitorových buněk T2D. Tyto výsledky naznačují, že stimulace gp130 pomocí Hyper-IL6 má u savců i u ptáků podobný efekt – synergické působení s dalšími faktory.

Klíčová slova:

Diferenciacie, erythropoesa, gp130, hematopoesa, hematopoetické buňky, Hyper-IL-6, Interleukin-6, transsignalizace

Abstract

Cloning, expression and characterization of recombinant growth factors

The role of growth factors and cytokines to regulate a variety of biological processes is ever increasing. Many studies have illustrated that this diverse group of proteins are capable of stimulating cellular growth, proliferation, survival, and cellular differentiation. This thesis mainly focuses on the cytokine interleukin-6 and its specific receptor (IL-6R). The IL-6R protein has been shown to exist as both a membrane-bound and soluble form. The soluble form of IL-6R (sIL-6R) signals via a mechanism called “transsignaling” that involves the receptor associating extracellularly with its ligand IL-6 to generate an IL-6/sIL-6R agonistic complex. This complex subsequently binds directly to another IL-6 receptor, gp130 that in turn activates it to augment a specific response.

It is known that the formation of the IL-6/sIL-6R complex can be greatly enhanced by converting it into a single molecule, called Hyper-IL-6. This fusion protein consists of a sIL-6R located at the N-terminus and IL-6 at the C-terminus separated by a flexible linker sequence. It was more than ten years since human Hyper-IL-6 was first described and since then, this molecule has proven to be an invaluable tool for characterizing potential transsignaling target cells and the consequential effects of gp130 activation in these cell types.

The main aim of this thesis was to prepare the first non-mammalian (chicken) Hyper-IL-6 molecule using molecular biology methodologies. In parallel, the chicken IL6 ligand and extracellular domain of its receptor (sIL-6R) were also expressed. Chicken Hyper-IL-6 was prepared to confirm the degree of evolutionary conservation between various molecular mechanisms and signaling pathways that are involved in the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells and their progenitors. Hyper-IL-6 was successfully expressed using a mammalian expression system and its resulting bioactivity was tested *in vitro*. Our results demonstrate that chicken Hyper-IL-6 was fully functional and when combined with other factors such as insulin and SCF was able to stimulate the chicken erythroid progenitor cell line, T2D to terminally differentiate. Our results illustrate that the activation of gp130 by Hyper-IL-6, in synergy with other factors, has a similar effect on both mammalian and avian cells suggesting this process is evolutionarily conserved.

Key words:

Differentiation, erythropoiesis, gp130, hematopoiesis, hematopoietic cells, Hyper-IL-6, Interleukin-6, transsignaling

Použité zkratky

bp	pár bází
BSA	Bovine Serum Albumin
CBM	Cytokine Binding Module
cDNA	complementary DNA
CLC	Cardiotrophin-Like Cytokin
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CT-1	Cardiotrophin-1
CXCR-4	CXC chemokine Receptor-4
Da	Dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	Epithelial Growth Factor
EPC	erytroidní progenitorová buňka
FGFs	Fibroblast Growth Factors
Flt-3L	Flt-3 Ligand
Gab-1	GRB-associated binder-1
GAPDH	Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GRB-2	Growth factor Receptor Bound protein-2
H ₂ O	voda
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonová kyselina
HSC	hematopoetická kmenová buňka
hu	human, lidský
ch	chicken, kuřecí
IL	Interleukin
IPTG	Iso-propyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MBÚ	Mikrobiologický ústav, AV ČR
MEP	Megakaryo-Erytroidní Progenitorová buňka
min	minuta
mRNA	messenger RNA
mu	murine, myší
NP	Neuropoietin
OSM	Oncostatin-M
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfatový pufr
PCR	polymerasová řetězová reakce
PIAS	Protein Inhibitors of Activated STAT

PKB	Protein Kinase B
RNA	ribonukleová kyselina
s	sekunda
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal cell Derived Factor-1
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SHP-2	Src homology-2-domain containing tyrosine phosphatase
SOCS	Supressors Of Cytokine Signaling
SOS	Son Of Sevenless
STAT	Signal Transducers and Activator of Transcription
TEP	Trombo-Erytroidní Progenitorová buňka
TGF alfa/beta	Transforming Growth Factor
TnT	<i>in vitro</i> transkripce/translace
ÚMG	Ústav molekulární genetiky, AV ČR
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
X-gal	5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Obsah

1. Úvod.....	- 10 -
2. Přehled literatury.....	- 11 -
2.1. Obecný úvod	- 11 -
2.1.1. Podstata a typy kmenových buněk	- 11 -
2.1.2. Mechanismy diferenciací kmenových buněk	- 12 -
2.1.3. Cytokiny a růstové faktory	- 13 -
2.2. Kmenové buňky kostní dřeně	- 14 -
2.2.1. Funkce a složení kostní dřeně	- 14 -
2.2.2. Nehematopoetické kmenové buňky kostní dřeně	- 15 -
2.3. Krvetvorba.....	- 16 -
2.3.1. Fáze krvetvorby a původ hematopoetických kmenových buněk.....	- 16 -
2.3.2. Hierarchie krevních buněk	- 16 -
2.3.3. Erytro-/megakaryopoese.....	- 18 -
2.4. Interleukin-6.....	- 19 -
2.4.1. Rodina proteinů interleukinu-6	- 19 -
2.4.2. Vlastnosti interleukinu-6	- 21 -
2.4.3. Signalizace interleukinu-6	- 21 -
2.4.4. Rozpustné receptory a transsignalizace	- 25 -
2.4.5. Hyper-IL-6	- 26 -
2.5. Kuře - modelový organismus	- 28 -
2.5.1. Ptačí erytro-/trombopoese	- 28 -
3. Materiál a metody	- 30 -
3.1. Materiál.....	- 30 -
3.1.1. Prokaryotické buňky.....	- 30 -
3.1.2. Média a živné půdy pro prokaryotické buňky	- 30 -
3.1.3. Eukaryotické buňky a tkáně	- 30 -
3.1.4. Média pro eukaryotické buňky.....	- 31 -
3.1.5. Vektory a jiné DNA	- 31 -
3.1.6. Cytokiny, růstové faktory a hormony.....	- 35 -
3.1.7. Enzymy	- 35 -
3.1.8. Oligonukleotidy	- 35 -

3.1.9.	Protilátky	- 35 -
3.1.10.	Soupravy pro molekulární biologii	- 35 -
3.1.11.	Materiál pro afinitní chromatografii	- 36 -
3.1.12.	Roztoky a pufrý.....	- 36 -
3.2.	Metody.....	- 38 -
3.2.1.	Práce s nukleovými kyselinami.....	- 38 -
3.2.2.	Práce s proteiny.....	- 43 -
3.2.3.	Práce s buňkami	- 45 -
4.	Výsledky.....	- 49 -
4.1.	Homologie.....	- 49 -
4.2.	Design primerů.....	- 49 -
4.3.	Reverzní transkripce a klonování IL-6, sIL-6R.....	- 49 -
4.4.	Klonování Hyper-IL-6.....	- 51 -
4.5.	Expres proteinů v <i>Escherichia Coli</i>	- 53 -
4.6.	<i>In vitro</i> transkripce/translace.....	- 55 -
4.7.	Expres IL-6, sIL-6R, Hyper-IL-6 v savčí buněčné linii HEK 293	- 55 -
4.8.	Expres proteinů v hmyzí buněčné linii <i>sf9</i> , <i>sf21</i>	- 58 -
4.9.	Biologická aktivita proteinů IL-6, sIL-6R, Hyper-IL-6	- 59 -
4.10.	Tkáňová expres IL-6R	- 62 -
5.	Diskuze.....	- 63 -
6.	Souhrn.....	- 67 -
7.	Seznam citované literatury	- 68 -
8.	Appendix.....	- 75 -
8.1.	Použité primery a oligonukleotidy	- 75 -
8.2.	Homologie.....	- 76 -
8.3.	DNA sekvence a primární struktura kuřecích IL-6 a IL-6R.....	- 79 -
8.4.	Primární aminokyselinové sekvence exprimovaných proteinů	- 82 -
8.4.1.	IL-6.....	- 82 -
8.4.2.	sIL-6R	- 83 -
8.4.3.	Hyper-IL-6	- 84 -
8.5.	Predikce lidského IL-6 signálního peptidu.....	- 85 -

1. Úvod

Cytokiny hrají důležitou roli během regulace nejrůznějších biologických dějů. Mezi tyto děje patří v první řadě krvetvorba a regulace imunní odpovědi. Dále se uplatňují během buněčné diferenciace a při mezibuněčné komunikaci. Jejich regulace je přitom zajištěna na různých úrovních, od regulace transkripce, translace a regulace stability proteinu až po regulaci pomocí tzv. rozpustných receptorů, jež jsou obvykle tvořeny pouze extracelulárními doménami zralých proteinů. Rozpustné receptory mohou mít v dané signalizační kaskádě jak funkci agonistickou, tak i funkci antagonistickou.

Tato práce pojednává zejména o cytokinu interleukin-6 (IL-6). IL-6 náleží do skupiny hemopoetinů a tvoří společně s dalšími faktory (LIF, IL-11, CNTF, OSM, CT-1, CLC, NP, IL-27 a IL-31) vlastní rodinu (rodina IL-6). Hlavním společným rysem této rodiny je sdílení receptoru gp130, jež je hlavní součástí receptorového komplexu. Pro aktivaci vnitrobuněčné transdukční kaskády indukované IL-6 je nutná a dostačující vzájemná fosforylace dvou gp130 intracelulárních podjednotek a intracelulární domény receptoru pro IL-6 (IL-6R) není potřeba (ROSE-JOHN and HEINRICH, 1994). Tento fakt je jak v přírodě, tak v medicíně využíván v procesu zvaném transsignalizace a uplatňuje se při něm rozpustný receptor pro IL-6 (sIL-6R).

Cílem této práce je:

- Molekulárně biologickými metodami připravit rekombinantní kuřecí fúzní protein Hyper-IL-6.
- Paralelně připravit kuřecí IL-6 a extracelulární doménu receptoru IL-6 (sIL-6R).
- Ověřit biologickou aktivitu těchto proteinů na modelu kuřecí hematopoesy.
- Definovat vliv proteinu Hyper-IL-6 na různé typy hematopoetických buněk.
- Potvrdit hypotézu, na jejímž základě je Hyper-IL-6 účinnější aktivátor IL-6 signalizační kaskády než samotný IL-6 a sIL-6R (PETERS et al., 1998).

Hyper-IL-6 se skládá z sIL-6R na N-konci a IL-6 na C-konci, přičemž obě podjednotky jsou kovalentně propojeny krátkou flexibilní sekvencí. Použití tohoto proteinu skýtá oproti použití samotného IL-6 mnohé výhody (např. mnohonásobně nižší efektivní koncentrace, aktivace IL-6R negativních buněk, atd.) a jako takový bude sloužit coby důležitý nástroj pro studium diferenciace hematopoetických a neurálních buněk.

V průběhu této diplomové práce bylo dosaženo následujících výsledků:

- Podařilo se připravit rekombinantní proteiny IL-6, sIL-6R, Hyper-IL-6.
- Protein IL-6 byl exprimován v buňkách *Escherichia coli*.
- Proteiny IL-6, sIL-6R a Hyper-IL-6 byly exprimovány v savčím expresním systému za použití buněk HEK 293.
- Proteiny IL-6, sIL-6R a Hyper-IL-6 byly exprimovány v bakulovirovém expresním systému.
- Aktivita těchto molekul byla ověřena v biologických testech *in vitro*.

2. Přehled literatury

2.1. Obecný úvod

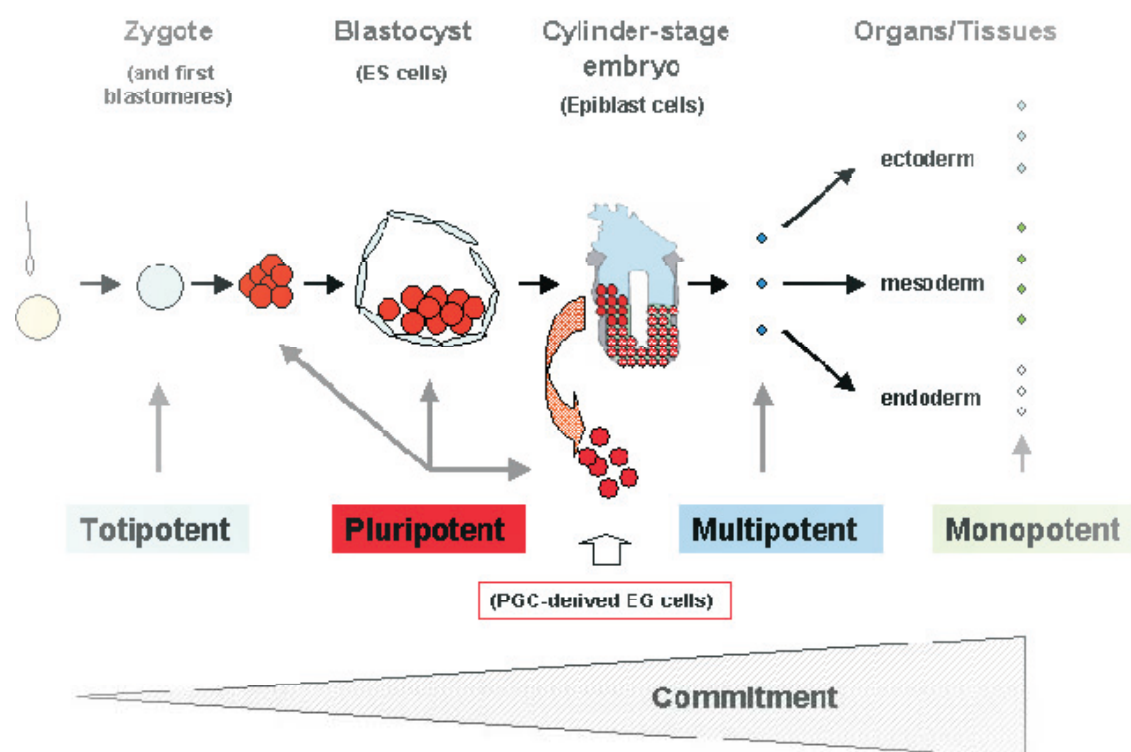
2.1.1. Podstata a typy kmenových buněk

Mnohobuněčný organismus se v dospělosti skládá zhruba z dvou set buněčných typů, ale na počátku ontogeneze to jsou pouze dvě buňky, ze kterých se celý zárodek vyvíjí. Podstatou vzniku takového množství odlišných buněčných typů je buněčná diferenciace. Dle nejzákladnějšího dělení rozlišujeme tři typy buněk. Jsou to - zárodečné buňky, kmenové buňky a buňky somatické, které bývají terminálně diferencované. Somatické buňky se do svého terminálního stadia mohou diferencovat v mnoha po sobě jdoucích krocích z různých typů kmenových buněk, které ačkoli nejsou morfologicky rozlišitelné, exprimují sadu proteinů regulujících geny typické pro jejich terminálně diferencované potomstvo. Dále platí, že z jedné kmenové buňky se může vyvinout řada různých buněčných typů.

Kmenové buňky dělíme do čtyř skupin. První skupinou jsou kmenové buňky totipotentní (označované také jako embryonální kmenové buňky). Jedná se o první blastoméry rýhující se zygoty. Jak název napovídá, jsou tyto buňky „všeho schopné“. Mohou tedy dát vzniknout kterémukoli ze tří zárodečných listů, včetně buněk extraembryonální tkáně (trofoblast). Naproti tomu buňky tvořící 32-buněčné embryonální stadium (stadium moruly) již ztrácejí svůj diferenciační potenciál a hovoříme o nich jako o kmenových buňkách pluripotentních. Tyto buňky se opět mohou diferencovat v kterýkoli zárodečný list, avšak diferenciace v trofoblast již není možná. Většina pluripotentních kmenových buněk se během gastrulace diferencuje v ektodermální, mezodermální a endodermální multipotentní kmenové buňky, které dále dávají vzniknout monopotentním (somatickým) kmenovým buňkám specifickým pro určitou tkáň nebo orgán (Obrázek 2.1.). Některé pluripotentní buňky však ve vyvíjejícím se organismu přetrvávají až do dospělosti a v malém množství kolonizují např. kostní dřeň (KUCIA et al., 2006; KUCIA et al., 2007).

Z mezodermálních multipotentních kmenových buněk vznikají monopotentní kmenové buňky hematopoetické, srdeční, endotheliální, mesenchymální, kosterně svalové a další. Z endodermálních multipotentních kmenových buněk vznikají monopotentní jaterní, pankreatické a střevně-epitheliální kmenové buňky a z ektodermálních multipotentních kmenových buněk se diferencují monopotentní mozkové, retinální pigmentové, periferní gangliové a nervové kmenové buňky stejně jako další kmenové buňky epidermální a pokožkové tkáně (RATAJCZAK et al., 2007). Je třeba podotknout, že tento výčet není ani zdaleka kompletní a různých druhů somatických kmenových buněk je ve skutečnosti daleko více.

Somatické kmenové buňky mají nejasný původ. Dodnes tato a řada dalších otázek není plně zodpovězena. Jsou somatické kmenové buňky pouhými pozůstatky embryonálních kmenových buněk nebo vznikají jinou cestou? Proč zůstávají tyto buňky v nediferencovaném stavu, když všechny buňky v okolní tkáni jsou diferencované? Které signály přesně regulují jejich proliferaci a diferenciaci? Ačkoli celou pravdu stále ještě neznáme, můžeme se pokusit o shrnutí dosavadních poznatků.



Obrázek 2.1.

Schéma vývojové hierarchie jednotlivých kmenových buněk. Totipotentní buňky mají nejvyšší diferenciací potenciál, naproti tomu u buněk monopotentních je tento potenciál nejnižší. Také v dospělém organismu se vyskytuje limitované množství pluripotentních kmenových buněk. Zdroj: (RATAJCZAK et al., 2007)

2.1.2. Mechanismy diferenciace kmenových buněk

Mechanismy přeměny zárodečné či kmenové buňky na některý více diferenciovaný typ jsou různé. Obecně těmito impulsy mohou být mezibuněčná komunikace prostřednictvím signálních molekul a jejich receptorů (nejčastěji pomocí cytokinů, růstových faktorů, hormonů a jiných látek), selektivní mezibuněčná adheze a programované změny exprese v genomu působením transkripčních faktorů.

Všechny tyto procesy se mohou podílet rovněž na udržování jednotlivých buněčných typů v tkáních. Podíváme-li se na jednotlivé mechanismy podrobněji, zjistíme, že pro diferenciaci buněk je velmi významná mezibuněčná komunikace prostřednictvím rozpustných signálních molekul a mezibuněčná adheze. Ta je mimo to odpovědná hlavně za orientaci buněk v tkáni, za distribuci jednotlivých typů v rámci celého organismu a za orientaci buněk v trojrozměrném prostoru. Jinými slovy, buňky mezi sebou musí selektivně vytvářet kontakty, aby nedošlo k jejich promíchání, a tyto kontakty jsou zprostředkovány různými adhezivními molekulami, umístěnými v plasmatické membráně, které se váží buď na své protějšky na membráně druhé buňky, nebo na složky extracelulární matrix.

Co se týče programovaných změn exprese působením transkripčních faktorů, dalo by se říci, že tento mechanismus je součástí vnitřního signálního okruhu u obou výše zmíněných typů

komunikací. Zde je však uveden v souvislosti s raným stadiem ontogeneze, kdy ještě není vytvořen dostatek sousedů pro komunikaci, a tak jediné, co zbývá, jsou transkripční faktory rozmístěné ve vajíčku, které podle gradientu svých koncentrací v jednotlivých částech vajíčka následně určují, v jakých místech se vyvine který buněčný typ.

V případě signalizačních molekul mohou buňky mezi sebou komunikovat třemi způsoby: endokrinně, parakrinně a autokrinně.

Endokrinně jsou uvolňovány především hormony, avšak mohou tak být vylučovány i některé růstové faktory, přičemž je třeba podotknout, že tato slova často bývají označována jako synonyma. Endokrinní vylučování je uvolňování látek do cévního systému a odtud do jednotlivých tkání mezi buňky samotné. Na druhou stranu způsobem parakrinním je vylučována většina růstových faktorů a cytokinů ve smyslu „tkáňových hormonů“ a jde o ovlivňování sousedních buněk přímo v tkáni. Na první pohled nejméně častým způsobem signalizace je autokrinní vylučování. Jedná se o uvolňování molekul a následně jejich přijímání tou samou buňkou. V poslední době tato forma signalizace nabývá stále většího významu a zdá se, že autokrinní uvolňování cytokinů a růstových faktorů hraje důležitou regulační roli i v těch nejzákladnějších diferenciačních procesech. Jako příklad lze uvést autokrinní uvolňování FGF4 embryonálními kmenovými buňkami, což má za následek aktivaci ERK1/2 signalizační kaskády a je nezbytné pro diferenciaci těchto buněk (KUNATH et al., 2007; STAVRIDIS et al., 2007).

2.1.3. Cytokiny a růstové faktory

Obecně mohou být cytokiny a růstové faktory různé, avšak jedno mají společné. Jedná se o extracelulární signální polypeptidy, řídící růst, proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. Každý cytokin a růstový faktor má svůj receptor (kombinaci receptorů) a buňka je na signál schopna reagovat pouze v případě, je-li vybavena receptorem pro tento signál nebo je-li schopna receptor nějakým způsobem přijmout ze svého okolí (JONES and ROSE-JOHN, 2002). Dále platí, že jeden typ signální molekuly se může vázat na více druhů receptorů a v závislosti na tom, se kterým receptorem interaguje, může interakce vyvolat někdy i značně rozdílnou odpověď. V takovém případě mluvíme o tom, že signální protein má pleiotropní účinky. Vazba na jediný receptor mnohdy není dostatečná, proto se signalizace často účastní více receptorů nebo pomocné receptory tzv. koreceptory.

Receptory cytokinů a růstových faktorů mívají enzymatickou (kinasovou) aktivitu nebo jsou s kinasami asociovány, někdy však bývají spojeny také s G-proteiny (SCHLESSINGER, 2000). Po navázání ligandu na odpovídající receptor dojde ke konformační změně a k aktivaci vnitrobuněčné signální kaskády díky fosforylaci intracelulárních receptorových domén. Většina receptorů cytokinů a růstových faktorů náleží mezi receptorový tyrosin kinasy (RTK; např. FGFR, EGFR, Kit), serin/threonin kinasy (např. TGF beta R) nebo jsou asociovány s cytoplasmatickými protein kinasami skupiny JAK, Src (SCHLESSINGER, 2000).

Aktivní (fosforylované) RTK ve většině případů přímo váží různé adaptorové proteiny (GRB-2, SOS, atd.), pomocí kterých je aktivována kaskáda Ras-RAF-MAP-ERK (SCHLESSINGER, 2000). Paralelně u mnoha RTK může signalizace probíhat přes aktivaci fosfolipasy C a štěpení fosfoinositol-

2-fosfatu na diacylglycerol (DAG) a inositol trifosfat (IP3). IP3 se váže na Ca²⁺ kanály na povrchu endoplasmatického retikula a tím je otevírá. Ca²⁺ společně s DAG aktivují protein kinasu C, která fosforyluje řadu substrátů, mezi něž patří i mnohé transkripční faktory. Ca²⁺ se rovněž váže na kalmodulin a tím ho také aktivuje (SCHLESSINGER, 2000). Výsledek je i v tomto případě stejný – aktivace transkripčních faktorů. Důležitým mezičlánkem u RTK některých růstových faktorů (např. FGF-4R) je fosfoinositol-3-fosfat kinasa, která přes aktivaci protein kinasy B (PKB) opět aktivuje Ras-MAPK-ERK kaskádu a signál je přenesen do jádra (SCHLESSINGER, 2000).

Situace u receptorů, které postrádají kinasovou aktivitu je o něco komplikovanější. Tyto receptory, jak již bylo naznačeno, obvykle po multimerizaci umožňují vazbu různých cytoplasmatických protein kinas. V případě receptorů pro cytokiny se jedná převážně o kinyasy rodiny JAK. JAK kinyasy se mohou (pokud jsou navázány v těsné blízkosti) vzájemně fosforylovat a zároveň mohou fosforylovat samotný receptor, čímž jsou vytvořena vazebná místa („docking sites“) pro další signální molekuly. Na samotné JAK se váží transkripční faktory skupiny STAT, které po fosforylaci dimerizují a je tak umožněn jejich transport do jádra (SCHLESSINGER, 2000). Různé receptory využívají různé JAK kinyasy a aktivují různé STAT proteiny, čímž je zajištěna vysoká komplexita. Další komplexita je zajištěna vazbou dalších kinas různých rodin (Src, Ras, PI3K, atd.) a tak jediný receptor může aktivovat sadu odlišných kaskád (HEINRICH et al., 2003).

Důležitou vlastností kinas je schopnost fosforylace většího počtu substrátů, a tak je signál během své cesty buňkou mnohanásobně amplifikován. Z toho vyplývá, že cytokiny s růstovými faktory jsou aktivní i při velmi nízkých koncentracích, což je jedna z jejich důležitých vlastností.

Cytokiny a růstové faktory mají jak pleiotropní (viz. výše), tak epistatický charakter (na dané vlastnosti se podílí více faktorů dohromady). Je zde tedy velmi složitá síť vzájemných interakcí, které mohou mít velmi široké účinky. Aktivované vnitrobuněčné signální molekuly mohou jak přímo i nepřímo (regulací genové exprese) regulovat nejrůznější metabolické dráhy, buněčný cyklus či měnit strukturu cytoskeletu. V neposlední řadě může být aktivována signální kaskáda, která buňku přiměje podstoupit programovanou buněčnou smrt – apoptozu.

Vysoká komplexita a složitost celého systému přináší mnoho výhod a jen díky této složitosti se eukaryotické buňky mohly vyvinout do dnešní podoby. Někdy má ale celý systém i své nevýhody. Často se stává, že některý člen signální kaskády selže. Přestože biologické systémy mají mnoho stupňů volnosti, těchto stupňů není nekonečně mnoho. Po překročení určité prahové hodnoty, systém přestane plnit své obranné funkce a tehdy může dojít např. ke vzniku nádorového bujení.

2.2. Kmenové buňky kostní dřeně

2.2.1. Funkce a složení kostní dřeně

Kostní dřeň je flexibilní tkáň, která se nalézá ve vnitřních dutinách kostí. Rozlišujeme 3 typy kostní dřeně – červenou kostní dřeň (*medulla ossium rubra*), žlutou kostní dřeň (*medulla ossium flava*) a šedou kostní dřeň (*medulla ossium grisea*) vznikající ve stáří. Červená kostní dřeň obsahuje různé typy kmenových buněk a probíhá v ní krvetvorba, naproti tomu žlutá kostní dřeň obsahuje převážně tukovou tkáň. Při narození je veškerá kostní dřeň červená, postupně se však během života organismu transformuje ve dřeň žlutou a červená dřeň přetrvává již jen ve většině plochých kostí

(kost pánevní, kost prsní, kosti žeberní, lebka, obratle a lopatky) a v houbovitě tkáni proximálních částí kostí stehenních a kostí pažních. Jako stroma se označuje veškerá tkáň kostní dřevě, která není přímo zapojena v procesu krvetvorby (tedy i žlutá kostní dřevě).

Kostní dřevě obsahuje mnoho typů jak kmenových, tak somatických buněk, které se uplatňují v řadě procesů. Mimo různé typy krevních buněk se v kostní dřevě nalézají např. chondroblasty, osteoblasty, myocyty, adipocyty a další.

Mezi nejčastější kmenové buňky kostní dřevě patří hematopoetické kmenové buňky (HSC). Z HSC dochází k diferenciaci veškerých krevních buněk. Je stále otázkou, jsou-li tyto buňky schopny procesu zvaného transdiferenciace, tedy diferenciaci v jiný buněčný typ než jsou buňky krevní řady. Dle předchozích experimentů byly HSC schopny transdiferenciace v myocyty, kardiomyocyty, hepatocyty, dále pak endoteliální, neurální a gliové buňky (JACKSON et al., 2001; BUZAŇSKA et al., 2002; CORTI et al., 2002; CORBEL et al., 2003; ORLIC et al., 2003; DI CAMPLI et al., 2004; SCINTU et al., 2006). Postupně se však ukazuje, že tyto výsledky by mohly být pouze artefaktem prováděných experimentů, při nichž byly použity nedostatečně purifikované HSC, které byly kontaminovány dalšími typy nehematopoetických kmenových buněk, jež byly nedávno identifikovány. Jedná se zejména o dva druhy pluripotentních somatických kmenových buněk, zvaných „Multipotent Adult Progenitor Cells“ (MAPCs) a „Very Small Embryonic-like stem cells“ (VSELs) (KUCIA et al., 2006).

2.2.2. Nehematopoetické kmenové buňky kostní dřevě

MAPCs byly izolovány jako subpopulace mesenchymálních kmenových buněk kostní dřevě a doposud jsou to jediné buňky kostní dřevě, které jsou schopny po injikaci do vyvíjející se blastocysty diferenciaci v jakýkoli ze tří zárodečných listů (JIANG et al., 2002).

Naproti tomu VSELs tvoří v kostní dřevě homogenní populaci malých buněk morfologicky podobných embryonálním buňkám (velké jádro, euchromatin). Tyto buňky jsou charakteristické rovněž expresí řadou markerů (např. Oct-4, Nanog, Rex-1, SSEA-1, Stella, Fragilis a další; (KUCIA et al., 2006), které jsou typické pro pluripotentní kmenové a primordiální zárodečné buňky (PGC). VSELs by tedy zřejmě mohly být pozůstatkem embryonálních PGC derivovaných z epiblastu, které přetrvávají v organismu do dospělosti. VSELs jsou vysoce mobilní a dalším proteinem, který je exprimován na jejich povrchu je receptor CXCR-4. Tento receptor váže protein SDF-1, který je sekretován stromálními fibroblasty kostní dřevě. Díky silné interakci mezi CXCR-4 a SDF-1 vytvářejí stromální fibroblasty v kostní dřevě vhodné mikroprostředí pro osídlení VSELs. Tato interakce má však i další důsledky. Izolované stromální buňky mohou být kontaminovány právě VSELs, což by mohlo vysvětlovat neočekávanou plasticitu kostně-dřevěných fibroblastů.

Mezi další typy nehematopoetických kmenových buněk kostní dřevě patří endoteliální progenitorové buňky a mesenchymální kmenové buňky (MSC). Endoteliální progenitorové buňky osidlují kostní dřevě, avšak v případě potřeby mohou být mobilizovány do periferního krevního systému, kde hrají roli při vaskularizaci poškozených tkání, orgánů (TAKAHASHI et al., 1999).

MSC jsou nezbytné pro udržení stálého mikroprostředí, ve kterém mohou růst a diferencovat se hematopoetické buňky (DEXTER and SPOONER, 1987). Tyto buňky se mohou diferencovat

v tukové, chrupavčité, svalové a kostní buňky a podílejí na regeneraci mesenchymálních tkání (kost, chrupavka, svaly, šlachy, tuková tkáň a stroma kostní dřeně) (PITTENGER et al., 1999).

2.3. Krvetvorba

2.3.1. Fáze krvetvorby a původ hematopoetických kmenových buněk

Krvetvorba neboli hematopoesa je proces tvorby krevních buněčných komponent. Tento děj se v organismech odehrává v kostní dřeni a v lymfatických tkáních, které jsou dvojího typu – primární (kostní dřeň, brzlík a Fabriciova burza u ptáků) či sekundární (slezina, lymfatické uzliny a jejich organizované shluky v dýchací a trávicí soustavě). Všechny krevní buňky se vyvíjejí z unipotentních HSC. Proces krvetvorby lze u obratlovců rozdělit do dvou fází – fáze embryonální (také prenatální) a fáze definitivní (postnatální). Obě tyto fáze se zásadně liší jak různým místem a časováním produkce krevních buněk, tak jejich morfologií a expresí odlišných genů (např. produkce různých typů hemoglobinu v obou fázích). Embryonální fáze je dočasná a ve vyvíjejícím se embryu k ní dochází v agregátech krevních buněk, nazývaných krevní ostrůvky („blood islands“), ve ventrálním mezodermu poblíž žloutkovému vaku (BARON, 2003). Ačkoli HSC těchto ostrůvků jsou schopny produkce všech krevních buněčných typů (kromě lymfocytů), produkují převážně červené krvinky.

Jakkoli je embryonální fáze krvetvorby dočasná, přebírají její funkci v dospělosti další specializované orgány, jako je slezina, játra a kostní dřeň. Kostní dřeň se nakonec stává hlavním místem krvetvorby v organismu a obsahuje jak myeloidní, tak lymfoidní progenitorové buňky. Původ HSC, které osidlují tyto orgány, není zcela jasný. Dle transplantačních experimentů z 80. let prováděných na kuřatech a na křepelkách tyto buňky pocházejí z oblasti laterálního mezodermu poblíž aorty, zvaného „aorta-gonad-mesonephros“ (AGM) region (DIETERLEN-LIÈVRE and MARTIN, 1981; CORMIER and DIETERLEN-LIÈVRE, 1988). Později tyto kmenové buňky kolonizují játra a nakonec osidlují kostní dřeň. Paradoxem však zůstává, že počet HSC v AGM regionu je příliš nízký na to, aby byl jediným zdrojem těchto buněk pro postnatální fázi hematopoesy, jelikož játra obsahují mnohonásobně větší množství HSC oproti regionu AGM. Z tohoto důvodu je pravděpodobné, že na kolonizaci jater se podílejí rovněž buňky krevních ostrůvků žloutkového vaku (KUMARAVELU et al., 2002), které jsou nyní v pozdějších stádiích vývoje již odlišné od primárních HSC krevních ostrůvků a jsou schopny diferenciaci také v lymfocyty. Dalším zdrojem HSC u savců jsou zřejmě také buňky placenty (GEKAS et al., 2005; OTTERSBACH and DZIERZAK, 2005).

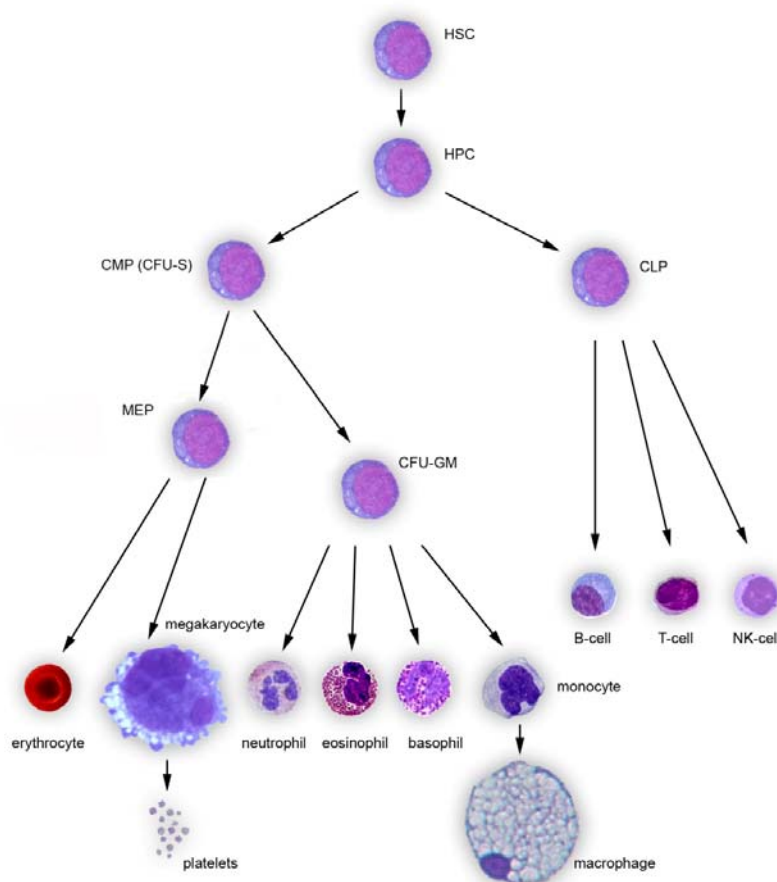
2.3.2. Hierarchie krevních buněk

Hematopoetické kmenové buňky (HSC) jsou nezbytné pro vývoj všech buněk krevní řady. Tyto buňky mají vysoký proliferační potenciál, který se však úměrně s jejich diferenciací snižuje. Příмым potomkem HSC je hematopoetická progenitorová buňka (HPC), která se dále může diferencovat v lymfoidní nebo myeloidní progenitorové buňky (AKASHI et al., 2000) (Obrázek 2.2.).

Z myeloidních progenitorů vznikají granulocyty (neutro-, eosino-, basofily), monocyty (dendritické buňky a makrofágy) a megakaryo-erytroidní progenitory (MEP) u savců (AKASHI et al., 2000), u ostatních obratlovců hovoříme o trombo-erytroidních progenitorech (TEP) (BARTUNEK et al., 2008).

Na druhou stranu z lymfoidních progenitorů vznikají NK buňky a prekurzory T-, B-lymfocytů. Ty se po patřičné stimulaci mohou přeměnit ve zralé efektorové buňky. Lymfoidní prekurzory vznikají v thymu a v kostní dřeni, odkud jsou poté krevním řečištěm unášeny do sekundárních lymfoidních orgánů, kde probíhá jejich zrání a diferenciace, nebo zůstávají v thymu a diferencují se přímo na místě.

Krevní buňky se diferencují pod vlivem cytokinů. Působení bývá většinou lokální a parakrinní, v některých případech však rovněž i autokrinní či endokrinní. Aby buňka byla schopna na jednotlivý cytokin vyvolat odpověď, musí být vybavena jeho receptorem, případně musí být schopna receptor ze svého okolí přijmout v procesu zvaném transsignalizace. Receptory cytokinů mají často promiskuitní charakter, navíc na buňku v určitou chvíli obvykle působí celá řada signálů najednou, v rámci tzv. cytokinové sítě. Jedná se o spolupůsobení nejrůznějších cytokinů pomocí nejrůznějších synergistických a antagonistických interakcí, které se vzájemně doplňují. Buňka všechny tyto signály mimořádně složitým způsobem analyzuje a vyhodnocuje, poté vyvolává odpověď. Často jde o součet jednotlivých pozitivních a negativních vstupů. Je tedy zásadní, které signály převažují. Dnes již známe mnoho kombinací konkrétních molekul, schopných vyvolat konkrétní odpověď.



Obrázek 2.2.

Schématické znázornění diferenciace jednotlivých krevních buněk savců. HSC – hematopoetická kmenová buňka, HPC – hematopoetická progenitorová buňka, CLP – lymfoidní progenitorová buňka, CMP – myeloidní progenitorová buňka, MEP – megakaryo-erytroidní progenitorová buňka, CFU-GM – granulocyt-monocyt progenitorová buňka. Zdroj: http://daley.med.harvard.edu/assets/Willy/Willy_noframes.htm

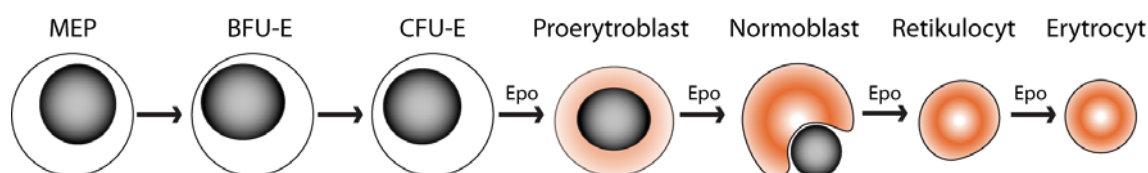
2.3.3. Erytro-/megakaryopoesa

Erytrocyty a trombocyty (krevní destičky) vznikají u savců z bi-potentních megakaryo-/erytroidních progenitorů (MEP) (AKASHI et al., 2000), u ostatních obratlovců se jedná o trombo-/erytroidní progenitory (TEP) (BARTUNEK et al., 2008).

2.3.3.1. Erytropoesa

Přímým erytroidním progenitorem MEP je buňka označovaná BFU-E („Burst Forming Unit – Erythroid“), ze které dále vzniká CFU-E („Colony Forming Unit – Erythroid“). K diferenciaci BFU-E na CFU-E není vyžadován erythropoetin (Epo). K přežití a následné postupné ireversibilní terminální diferenciaci CFU-E na erytrocyt je však Epo nezbytné (WU et al., 1995). Z CFU-E vzniká proerytroblast - první buňka exprimující globin a během dozrávání proerytroblastu na erytroblast dochází k jeho enormní produkci. Dalším vývojovým stadiem je normoblast, který ztrácí jádro a stává se retikulocytem. Ačkoli retikulocyt nemá jádro a nemůže tak syntetizovat globinové a jiné mRNA, stále ještě může translatovat zbylé stávající mRNA. Posledním stadiem diferenciaci je erytrocyt, zralá červená krvinka (Obrázek 2.3.). Přestože jádro u ptáků, ryb a obojživelníků zůstává přítomno v buňce, DNA kondenzuje a je nefunkční. U erytrocytů všech obratlovců nedochází k buněčnému dělení, syntéze mRNA, ani k proteosyntéze.

Existují různé populace erytroidních progenitorových buněk (EPC), které se od sebe odlišují rozdílnou expresí některých povrchových molekul. Většina EPC exprimuje c-kit (receptor SCF) a EpoR a je tzv. SCF, Epo dependentní (PANZENBOCK et al., 1998). *In vitro* diferenciaci EPC probíhá v prostředí Epo a insulinu (LACOMBE and MAYEUX, 1998; PANZENBOCK et al., 1998).



Obrázek 2.3.

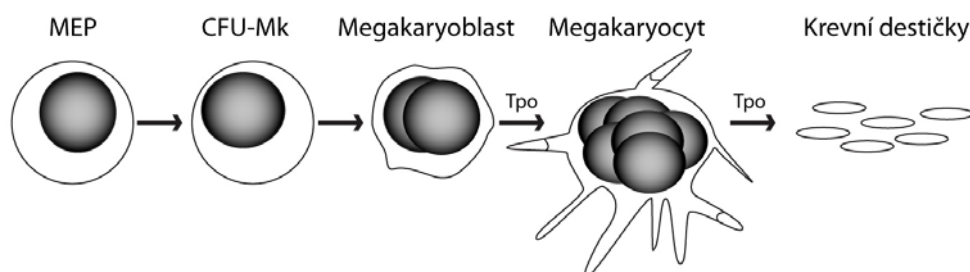
Schéma savčí erytropoesy. Proerytroblast začíná syntetizovat globin (červeně) a v dalších stadiích již dochází k jeho enormní produkci. Erukleace probíhá ve stadiu normoblastu.

2.3.3.2. Megakaryopoesa

Megakaryopoesa je určitým způsobem podobná erytropoesi. Z MEP progenitorů se diferencují CFU-Mk („Colony Forming Unit – Megakaryocyte“), ze kterých dále vznikají megakaryoblasty. U megakaryoblastu dochází k endoreduplikaci a reorganizaci cytoskeletu a vzniká tak polyploidní megakaryocyt, ze kterého se následně odštěpují krevní destičky (Obrázek 2.4.) (SCHULZE and SHIVDASANI, 2005). Důležitým regulátorem trombopoese je trombopoetin (Tpo). Tpo a jeho receptor (c-mpl) je pro vznik krevních destiček *in vivo* esenciální, ne však nepostradatelný. U $Tpo^{-/-}$ a $mpl^{-/-}$ myši sice byl pozorován 90% úbytek krevních destiček, přesto byly myši životaschopné a nebyla pozorována nadměrná krvácení (ALEXANDER, 1999). Tato pozorování poukazují na to, že Tpo spíše řídí proliferaci megakaryocytů a množství destiček nežli regulaci jejich vývoje a že musí existovat další alternativní dráhy, směřující k biogenezi trombocytů. Některé tyto

dráhy již byly identifikovány a uplatňují se v nich molekuly jako IL-11 (TURNER et al., 1996) a SDF-1/CXCR-4 (AVECILLA et al., 2004).

U $Tpo^{-/-}$ a $mpl^{-/-}$ myši byl poněkud překvapivě také zjištěn úbytek progenitorových buněk všech hematopoetických linií. Tpo tedy hraje centrální roli v regulaci hematopoetických kmenových buněk (SITNICKA et al., 1996; SOLAR et al., 1998; ABKOWITZ and CHEN, 2007).



Obrázek 2.4.

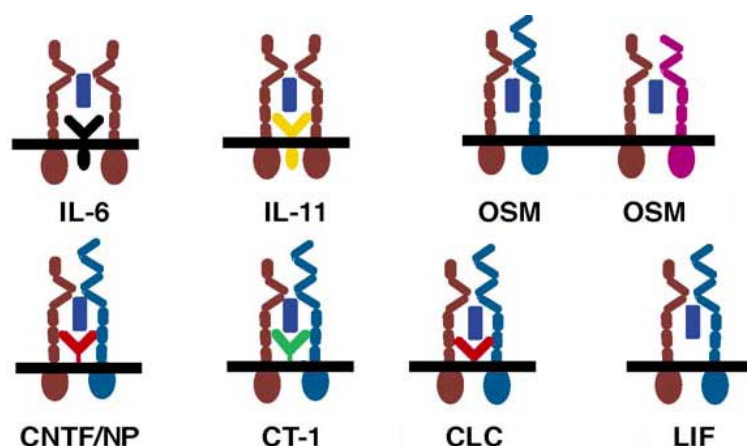
Schéma savčí trombopoese. Ve stadiu megakaryoblastu postupně dochází k endoreduplikaci a reorganizaci cytoskeletu za vzniku polyploidního megakaryocyty. Z toho se posléze odštěpují krevní destičky.

2.4. Interleukin-6

2.4.1. Rodina proteinů interleukinu-6

Hlavním charakteristickým rysem cytokinů rodiny interleukinu-6 (IL-6) je působení přes receptorové komplexy obsahující alespoň jednu podjednotku gp130 (TAGA and KISHIMOTO, 1997). Tato rodina kromě IL-6 dále zahrnuje leukemia inhibitory factor (LIF), IL-11, ciliary neurotrophic factor (CNTF), oncostatin-M (OSM), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin-like cytokin (CLC), neuropoetin (NP), IL-27 a IL-31 (TAGA and KISHIMOTO, 1997; DEROUET et al., 2004; DILLON et al., 2004; PFLANZ et al., 2004). Tyto proteiny sdílejí společnou helikální strukturu tvořenou čtyřmi antiparalelním alfa helixy a patří do skupiny cytokinů I neboli hemopoetinů (BAZAN, 1990). Členové rodiny IL-6 mají vysoce pleiotropní a redundantní funkce (Tabulka 2.1.) (AUERNHAMMER and MELMED, 2000).

Tato redundance je zapříčiněna především promiskuitním receptorem gp130, který hraje roli vysokoafinitního konvertoru a ve všech případech se přímo podílí na přenosu signálu do buňky. Dalšími promiskuitními receptory podílejícími se na přenosu signálu jsou LIFR a OSMR. Tyto receptory jsou označovány jako beta receptory. Naproti tomu receptory alfa (IL-6R, IL-11R, CT-1R, CNTFR) se na transdukcii signálu nepodílejí. Ligand obvykle váže s nízkou afinitou a kromě CNTFR jsou specifické - CNTFR mimo jiné váže CLC v kombinaci s proteinem zvaným cytokin-like faktor-1 (CLF) a NP (ELSON et al., 2000; JONES and ROSE-JOHN, 2002; DEROUET et al., 2004) (Obrázek 2.5.).



Obrázek 2.5.

Receptory rodiny IL-6. Receptorové komplexy jsou složeny z beta receptorů gp130 (hnědě), LIFR (modře) nebo OSMR (fialově) a v některých případech ze specifických alfa receptorů IL-6R (černě), IL-11R z komplexu CNTFR-CLF (červeně). IL-6 a IL-11 jsou jedinými proteiny rodiny IL-6, jejichž signalizace probíhá pouze pomocí gp130. Zdroj: Upraveno z (JONES and ROSE-JOHN, 2002)

Receptory rodiny IL-6 postrádají vlastní kinasovou aktivitu a nejčastěji spouštějí cytoplasmatické kinasy skupiny JAK, které dále aktivují transkripční faktory STAT. Může však docházet i k zapojení Hck a dalších tyrosin kinas skupiny Src, k aktivaci adaptorových proteinů jako je Ras, Raf-1 a tím aktivaci MAP kinasové kaskády (ERNST et al., 1996; TAGA and KISHIMOTO, 1997; SCHIEMANN and NATHANSON, 1998; HEINRICH et al., 2003). Regulace aktivity těchto receptorů probíhá na několika úrovních - regulací exprese, mechanismem zvaným transsignalizace (viz. níže), internalizací receptoru a v neposlední řadě aktivitou fosfatasy a inhibitorů jako jsou proteiny SHP-2 (SH2-domain-containing tyrosine phosphatase), SOCS (Supressors Of Cytokine Signaling) nebo PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT) (CHUNG et al., 1997; STARR et al., 1997; LIU et al., 1998; STOFEGA et al., 1998; HEINRICH et al., 2003).

Fosfatasa SHP-2 je aktivována JAK1 kinasou a defosforyluje intracelulární doménu gp130, čímž je zrušena přítomnost vazebných míst pro STAT, i samotné JAK/STAT. Podobným způsobem fungují SOCS proteiny, které se váží na katalytické domény JAK kinas, čímž je inaktivují. Naproti tomu PIAS se přímo váží na STAT1, STAT3 a blokuje tak jejich vazbu na DNA.

Tabulka 2.1.

Cytokine-mediated effect	IL-6	IL-11	LIF	OSM	CNTF	CT-1
Maintenance of ES cell pluripotentiality	-/+	-	+	+	+	+
Macrophage differentiation in M1 cells	+	-	+	+	-/+	+
Growth promotion of myeloma cells	+	+	+	+	+	nd
Promotion of thrombopoiesis	+	+	+	+	nd	nd
Induction of hepatic acute phase proteins	+	+	+	+	+	+
Induction of ACTH secretion <i>in vivo</i>	+	+	+	+	+	+
Induction of ACTH secretion <i>in vitro</i>	-/+	+	+	+	nd	nd
Neural differentiation	+	+	+	+	+	+
Induction of bone loss/osteoclast formation	+	+	+	+	nd	nd
Induction of cardiac hypertrophy <i>in vitro</i>	-/+	+	+	+	+/-	+

Tato tabulka znázorňuje překrývající se funkce některých cytokinů rodiny IL-6 (AUERNHAMMER and MELMED, 2000).

2.4.2. Vlastnosti interleukinu-6

IL-6 je multifunkční cytokin, který hraje důležitou roli v regulaci imunitního systému, akutní fáze a hematopoiesy (BAZAN, 1990). IL-6 je produkován mnoha typy buněk a působí na B buňky (HIRANO et al., 1986), T buňky (HOUSIAU et al., 1988), hepatocyty (GAULDIE et al., 1987), hematopoetické buňky (IKEBUCHI et al., 1987) a buňky centrálního nervového systému (SATO et al., 1988).

Multifunkční chování IL-6 je odraženo v řadě názvů, které mu byly postupně uděleny. Poprvé byl identifikován a označen jako B Cell Differentiation Factor (BCDF) (OKADA et al., 1983) a později coby B cell Stimulatory Factor-2 (BSF-2) (HIRANO et al., 1986), faktor stimulující maturaci B-lymfocytů a sekreci protilátek. Dále byl IL-6 označován jako Interferon- β 2 (IFN- β 2) (MAY et al., 1986). Toto označení se však ukázalo jako nesprávné, jelikož IL-6 interferonovou antivirální aktivitu nevykazuje (HIRANO et al., 1988). IL-6 stimuluje hepatocyty k uvolňování proteinů akutní fáze a tak jeho dalším názvem je hepatocytární stimulační faktor (HSF) (ANDUS et al., 1987).

IL-6 je produkován fibroblasty, leukocyty a endoteliálními buňkami. Fibroblasty produkováný IL-6 zvyšuje expresi M-CSF receptorů na monocitech a je tak odpovědný za přepnutí diferenciace monocytů z dendritických buněk na makrofágy (CHOMARAT et al., 2000). Dále IL-6 moduluje Th1/Th2 odpověď. Indukcí proteinů SOCS a IL-4 inhibuje IL-6 Th1 (CD8+) diferenciaci ve prospěch Th2 (CD4+) (DIEHL et al., 2000; DIEHL et al., 2002). Podobně IL-6 indukuje růst a diferenciaci cytotoxických T-lymfocytů pomocí exprese IL-2 a jeho receptoru (NOMA et al., 1986; HIBI et al., 1990). IL-6 hraje roli také v neoangiogenezi *in vivo* (GIRAUDO et al., 1996). Výše uvedené funkce IL-6 se omezují pouze na buňky exprimující IL-6R. Větší část svých aktivit vykonává IL-6 v kooperaci s rozpustnou formou svého receptoru (sIL-6R) mechanismem zvaným transsignalizace (viz. níže).

2.4.3. Signalizace interleukinu-6

IL-6 se nejprve nízkoafinitně a specificky váže na IL-6R, který poté heterodimerizuje s první gp130 molekulou a tvoří tak vysokoafinitní komplex. Následně dochází k vazbě druhé gp130 podjednotky a k transdukci signálu (SCHROERS et al., 2005).

Při vysoké koncentraci komplexu IL-6/IL-6R váže gp130 dimer 2 tyto komplexy za vzniku receptorového hexameru. Ačkoli na tuto konfiguraci jasně ukazují rentgenové krystalografické studie (BOULANGER et al., 2003), tento stav se za fyziologických podmínek zdá být nepravděpodobný (SCHROERS et al., 2005).

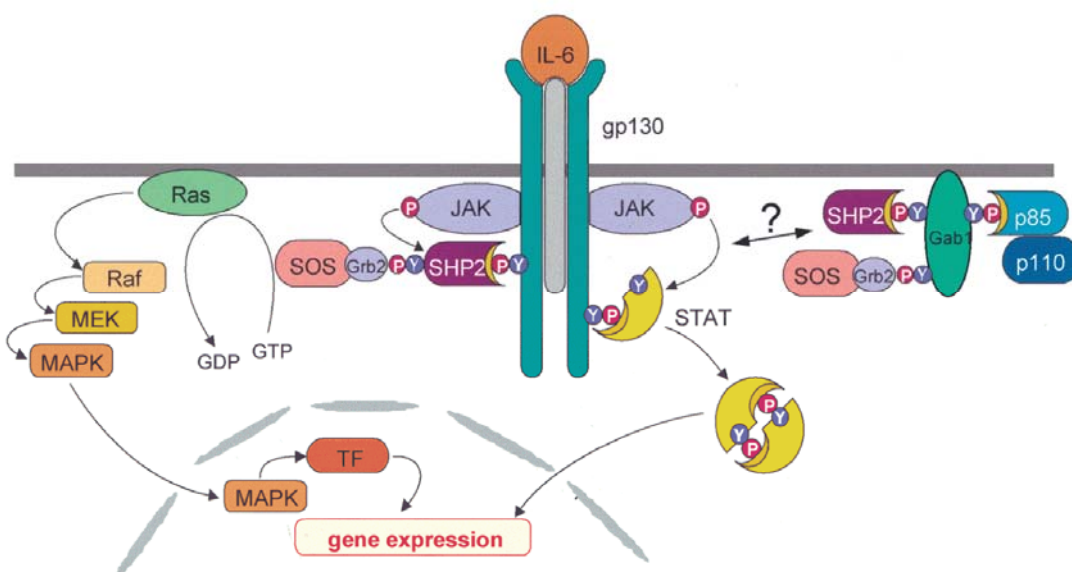
Intracelulární doména IL-6R je krátká (hIL-6R - 82 aminokyselin) a v dalším přenosu signálu nehraje žádnou roli. IL-6R je tedy nezbytný pouze pro sestavení receptorového komplexu a vlastní signalizace probíhá výhradně pomocí vytvořeného gp130 dimeru (TAGA and KISHIMOTO, 1997). Na IL-6 aktivované gp130 dimery se v první řadě váže JAK1 a hraje zde centrální roli (MURRAY, 2007). Další kinas skupiny JAK, které jsou aktivovány působením IL-6 jsou JAK2 a TYK2. JAKs jsou po vazbě na gp130 aktivovány a fosforylují skupinu několika tyrosinů, čímž jsou vytvořena vazebná místa („docking sites“) pro transkripční faktory STAT3 a STAT1 (MURRAY, 2007). STATs se na fosforylované gp130 vážají svými SH2 (Src homology 2) doménami a následně jsou fosforylovány na

jediném tyrosinu, čímž je umožněna jejich dimerizace, na které se opět podílejí SH2 domény. STATs se tak stávají aktivními transkripčními faktory a je umožněn jejich transport do jádra, kde řídí transkripci několika genů (HEINRICH et al., 2003).

Dimerizace gp130 však nevede pouze k aktivaci STATs, ale dochází i k zapojení dalších signalizačních drah, např. MAPK a PKB (HEINRICH et al., 2003) (Obrázek 2.6.).

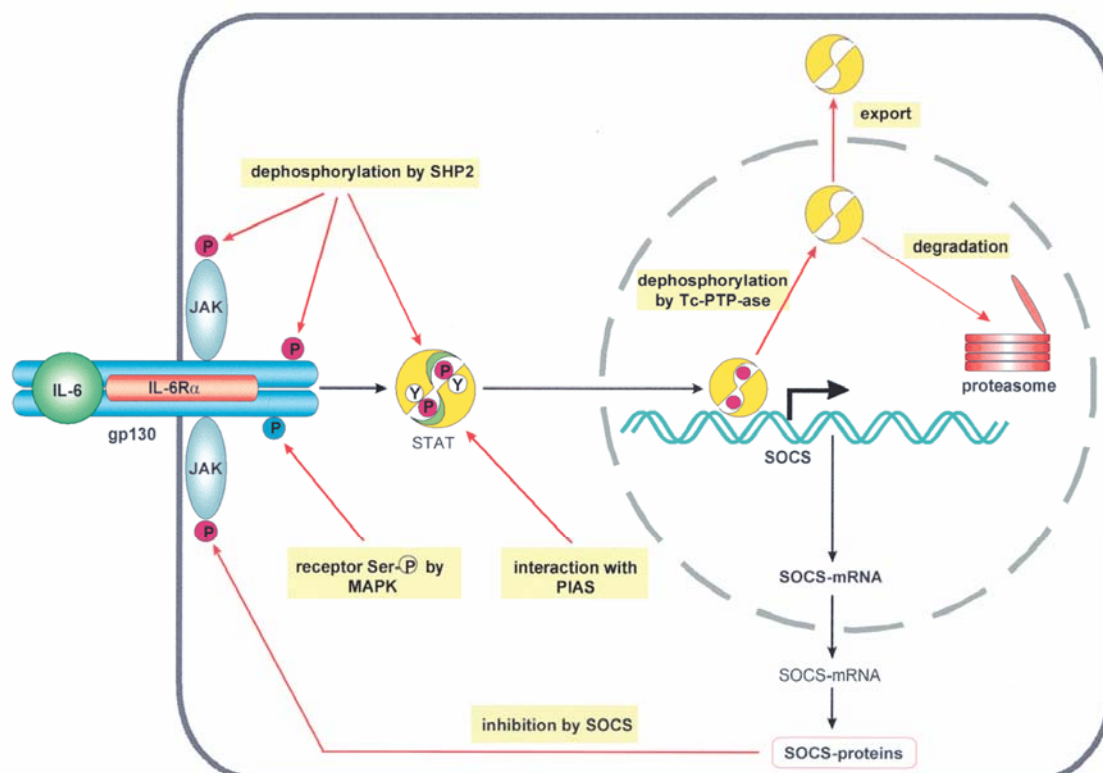
Významnou roli zde hraje fosfatasa SHP-2, která se váže na gp130 a je fosforylována pomocí JAK1. SHP-2 funguje jako adaptor signálu mezi GRB-2 (Growth-factor-receptor-bound protein) a SOS (Son of Sevenless) nebo Gab-1 (Grb-associated binder) a gp130. SOS a Gab-1 následně aktivují kaskádu Ras-Raf-MAPK-ERK1/2. Gab-1 přitom aktivuje také PI3K-PKB/Akt kaskádu. Mezi substráty Akt patří např. pro-apoptotický protein Bad, jehož fosforylace je asociována s přežitím a buněčným růstem.

Na negativní regulaci gp130 se podílejí MAPK, SHP-2, SOCS a PIAS (Obrázek 2.7.). MAPK fosforyluje serin v místě tzv. di-leucinového motivu na gp130 a receptor je tak internalizován (HEINRICH et al., 2003). SHP-2 defosforyluje fosforylované tyrosiny na gp130, JAK a dokonce i na STAT (STOFEA et al., 1998; HEINRICH et al., 2003). Mezi JAK/STAT indukované proteiny patří SOCS, které následně JAKs inhibují pomocí negativní zpětné vazby (STARR et al., 1997). Naproti tomu PIAS specificky blokuje STATs a brání jejich vazbě na DNA (CHUNG et al., 1997; LIU et al., 1998).



Obrázek 2.6.

IL-6 po aktivaci receptorového komplexu aktivuje převážně JAK/STAT signální kaskádu. Dochází však také k napojení na MAP kinasovou dráhu přes fosfatasu SHP-2 a k aktivaci PI3K-PKB pomocí Gab-1. Zdroj: (HEINRICH et al., 2003)

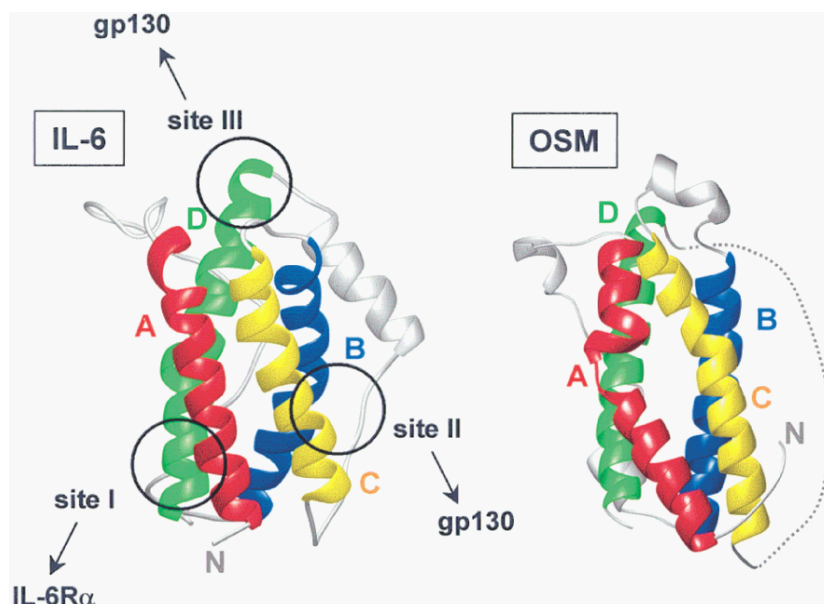


Obrázek 2.7.

IL-6 signální kaskáda je negativně regulovaná pomocí proteinů SOCS, PIAS, fosfatasy SHP-2 a dalších, a pomocí MAPK. Mechanismus inhibice jednotlivých proteinů se liší. Proteiny SOCS se vážou a inhibují JAKs. Podobně fungují proteiny PIAS, které inhibují STATs. Fosfatasa SHP-2 v cytoplasmě defosforyluje fosforylované tyrosiny na JAK/STAT. Naproti tomu T-buněčná protein tyrosin fosfatasa (Tc-PTP-ase) defosforyluje STATs proteiny translokované v jádře. MAPK fosforyluje serin di-lucinového motivu gp130, což napomáhá internalizaci receptoru. Zdroj: (HEINRICH et al., 2003)

2.4.3.1. Struktura proteinů rodiny interleukinu-6

Všechny proteiny rodiny IL-6 jsou tvořeny čtyřmi dlouhými alfa helixy označovanými A, B, C, D (Obrázek 2.8.). Helix A je u IL-6 a IL-11 rovný, na rozdíl od proteinů LIF, OSM a CNTF, u kterých je tentýž helix ohnutý (Obrázek 2.8.). Tato strukturní odlišnost by mohla vysvětlovat rozdíl v mechanismu působení obou skupin – IL-6 cytokiny s ohnutým helixem A působí přes heterodimer gp130-LIFR nebo gp130-OSMR, zatímco cytokiny s rovným helixem A působí přes homodimer gp130-gp130 (BRAVO and HEATH, 2000). Na povrchu IL-6 se nachází několik míst („sites“), pomocí kterých IL-6 interaguje s receptory (PFLANZ et al., 2000). Tato místa jsou – site I, site II a site III. Site II se nachází na všech cytokinech rodiny IL-6 a slouží k vazbě gp130 pomocí gp130 sekvence s označením CBM („cytokine binding module“). Druhý signalizující receptor (gp130, LIFR nebo OSMR) je vázán díky site III. Toto místo je přitom na receptoru rozpoznáváno Ig doménou a je tedy zajímavé, že homodimer gp130 váže IL-6 pomocí dvou různých epitopů. Nakonec, vyskytuje-li se v receptorovém komplexu alfa receptor, pak váže ligand pomocí CBM na site I.



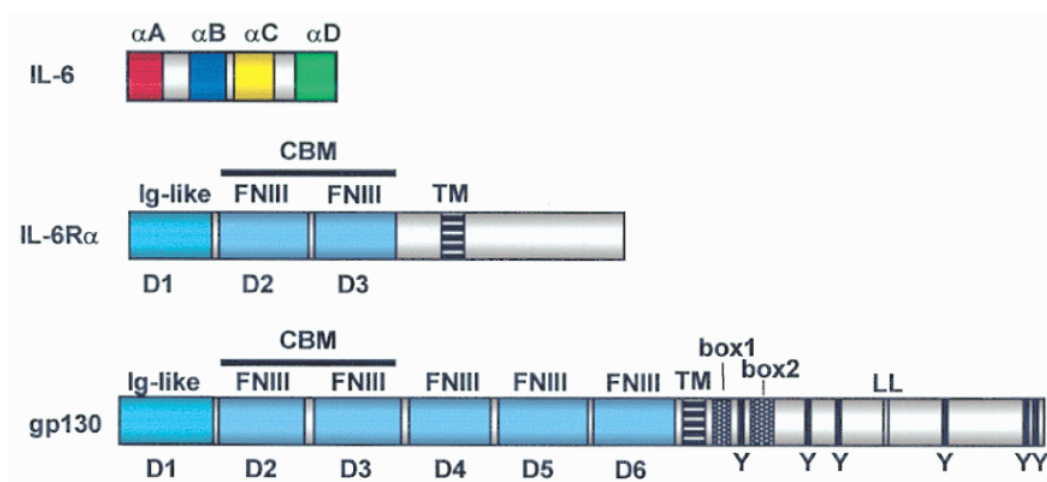
Obrázek 2.8.

A, B, C, D znázorňují čtyři alfa helixy IL-6/OSM. U některých členů rodiny IL-6 je helix A ohnutý (OSM, LIF, CNTF). Tyto cytokiny se váží na heterodimer gp130-OSMR, případně gp130-LIFR, což by mohlo být důsledkem ohnutého helixu A. Site I, II, III označují místa interakce ligandu a receptoru. Zdroj: (HEINRICH et al., 2003)

2.4.3.2. Struktura receptorů gp130 a IL-6R

Extracelulární část gp130 a IL-6R se skládá z pěti, případně dvou FNIII (fibronectin type III) domén a jedné Ig-like domény (Obrázek 2.9.). Každý z receptorů přitom obsahuje jedno CBM, dlouhé přibližně 200 aminokyselin. CBM se skládá ze dvou FNIII domén, přičemž první N-terminální FNIII doména obsahuje 4 pozičně konzervované cysteiny, druhá C-terminální FNIII doména obsahuje konzervovaný motiv WSXWS (W, tryptofan; S, serin; X, nekonzervovaná aminokyselina). Tento motiv je charakteristický pro všechny cytokiny skupiny I (TAGA and KISHIMOTO, 1997).

Přestože extracelulární části gp130 a IL-6R jsou si podobné, u intracelulárních částí obou receptorů je tomu naopak. To je dáno tím, že IL-6R se nepodílí na vnitrobuněčné signalizaci a tak je jeho intracelulární část dlouhá pouze 82 aminokyselin a nevyskytují se v ní žádné konzervované sekvence. Intracelulární doména gp130 obsahuje kromě několika funkčně významných tyrosinů konzervované sekvence označované jako box1, box2 a di-leucinový motiv. Proliny boxu1 jsou zásadní pro vazbu JAKs a tryptofan 652 boxu1 je esenciální pro aktivaci JAKs (HAAN et al., 2002). Na druhou stranu box2 spíše pouze napomáhá vazbě JAKs (HAAN et al., 2002) a je tvořen sekvencí, v níž se po sobě opakují hydrofobní a nabitě aminokyseliny. Důležitá je též oblast mezi boxy1 a 2, kde se vyskytuje tryptofan 666, který je rovněž nezbytný pro vazbu JAK (HAAN et al., 2000). Struktura domén IL-6, IL-6R a gp130 je zobrazena na Obrázku 2.9.



Obrázek 2.9.

Struktura IL-6, IL-6R a gp130. αA , αB , αC , αD – alfa helixy IL-6; CBM – cytokine binding module; TM – transmembránová doména; LL – di-leucinový motiv; Y – tyrosin. Zdroj: (HEINRICH et al., 2003)

2.4.4. Rozpustné receptory a transsignalizace

Jakkoli je gp130 exprimován ve většině ne-li ve všech buňkách organismu, vysoká exprese IL-6R je omezena pouze na hepatocyty, některé hematopoetické buňky a na astrocyty (TAGA, 1992; TAJIMA et al., 1996; SANZ et al., 2008). Zatímco je však exprese gp130 pro přenos IL-6 signálu nezbytná, přítomnost IL-6R na povrchu buňky vyžadována není a IL-6 může za určitých okolností aktivovat také buňky neexprimující IL-6R (IL-6R^{neg.}). Během tohoto děje se uplatňuje rozpustná forma extracelulární části IL-6R (sIL-6R), která má agonistickou funkci, a tento jev je označován jako transsignalizace (ROSE-JOHN and HEINRICH, 1994). Rozpustné receptory se v přírodě vyskytují často, avšak případy, kdy mají agonistickou funkci, jsou poměrně vzácné (mimo sIL-6R také sCNTFR a sIL-11). Většina rozpustných receptorů má funkci antagonistickou, brání tedy vazbě ligandu na buňku (např. sLIFR, nebo sgp130) (OWCZAREK et al., 1996; JONES and ROSE-JOHN, 2002). Během transsignalizace IL-6 extracelulárně váže sIL-6R a tento komplex přímo aktivuje gp130. Tímto způsobem mohou buňky jednoho typu generující sIL-6R činit buňky druhého typu IL-6R^{neg.} senzitivní vůči působení IL-6. Transsignalizace je velmi významným mechanismem a má široké uplatnění jak *in vivo*, tak *in vitro*.

2.4.4.1. Vznik rozpustných receptorů

Vznik rozpustných forem receptorů je úzce regulován a podílí se na něm dva mechanismy (ROSE-JOHN and HEINRICH, 1994; HOOPER et al., 1997). Prvním mechanismem je diferenciální mRNA splicing, který vede k sekreci proteinů postrádající cytoplasmatickou a transmembránovou doménu. Mezi rozpustné receptory, generované tímto způsobem patří např. receptory pro IL-4, EGF nebo LIF (ROSE-JOHN and HEINRICH, 1994). Druhým mechanismem vzniku rozpustných receptorů přímo z buněčného povrchu je proteolytické štěpení (HOOPER et al., 1997). Proteasy uplatňované během tohoto procesu patří do ADAM rodiny metaloproteas (MULLBERG et al., 2000). Mezi receptory, procesované tímto mechanismem náleží např. IL-1R, IL-2R, TNF alfaR nebo PDGFR. Mnoho rozpustných receptorů vzniká oběma zmíněnými způsoby a do této kategorie patří i sIL-6R a sgp130 (ROSE-JOHN and HEINRICH, 1994).

2.4.4.2. Působení komplexu IL-6/sIL-6R

Mezi buňky, které odpovídají na kombinaci IL-6/sIL-6R a nikoli na samotný IL-6 patří hematopoetické progenitorové buňky, endotheliální buňky, buňky nervové a některé další (SUI et al., 1995; HIROTA et al., 1996; PETERS et al., 1997; ROMANO et al., 1997). Hematopoetické progenitorové buňky mohou být mimo jiné rozděleny do populací exprimujících (30-50 %) a neexprimujících IL-6R (IL-6R^{pos./neg.}) (TAJIMA et al., 1996), obě tyto populace při tom exprimují gp130. Bylo ukázáno, že z populací exprimujících IL-6R se formují granulocyt-makrofágní kolonie, kdežto z populací IL-6R^{neg.} po stimulaci různými kombinacemi cytokinů (SCF, IL-3, IL-6, sIL-6R) dochází ke vzniku různých typů kolonií zahrnujících erytroidní progenitory, megakaryocyty a granulocyty-monocyty (TAJIMA et al., 1996). Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími experimenty, ve kterých bylo dosaženo stejných závěrů (SUI et al., 1995; PETERS et al., 1997; FUJISAKI et al., 1999; SUI et al., 1999; AUDET et al., 2001; PETERS et al., 2001). Stimulace primitivních hematopoetických progenitorů pomocí IL-6/sIL-6R, SCF nebo IL-6/sIL-6R, Flt-3L vede k účinné expanzi těchto buněk (SUI et al., 1995; AUDET et al., 2001). Na druhou stranu stimulace erytroidních progenitorů pomocí IL-6/sIL-6R vede k plné diferenciaci a maturaci těchto buněk (YU et al., 2006).

IL-6 se spolu s rozpustnou formou svého receptoru podílejí na regeneraci jater (PETERS et al., 2000) a na diferenciaci osteoklastů (TAMURA et al., 1993).

IL-6^{-/-} myši se vyvíjejí na první pohled normálně, ale mají sníženou akumulaci leukocytů v místech zánětu, což je zapříčiněno redukovanou produkcí chemokinů *in situ*. IL-6 a sIL-6R indukují expresi endotheliálních adhezivních molekul a endotheliální produkci proteinu MCP-1 (monocyte-chemoattractant-1), který je odpovědný za chemotaxi monocytů (ROMANO et al., 1997).

IL-6/sIL-6R navíc řídí průběh zánětlivých reakcí. Např. infekce peritonea vede k uvolňování prozánětlivých molekul jako IL-1 β , TNF α , IL-6 a chemokinů CXC z peritoneálních mesotheliálních buněk. Pod vlivem CXC do místa poškození pronikají neutrofily, které uvolňují sIL-6R. Uvolněním sIL-6R a jeho působením spolu s IL-6 na peritoneální buňky je umožněna produkce dalších chemokinů jako CC a inhibice CXC. Díky tomu neutrofily odcházejí a jsou díky působení CC vystřídány monocyty (HURST et al., 2001).

Jistou roli hraje též působení IL-6/sIL-6R na neurální buňky. Účinky mohou být různé – od indukce syntézy enzymů, proteinů a látek jako je cholin neuropeptid acetyltransferasa, substance P, cholecystokinin až po neurální přežití, zvýšení indukce TNF α a indukci diferenciacie astrocytů (MARZ et al., 1999).

Závěrem lze říci, že IL-6/sIL-6R se podílejí na proliferaci synoviálních fibroblastů u pacientů s revmatoidní artritidou (MIHARA et al., 1995) a na různých poruchách spojených s poškozením chrupavek a kostí (KUDO et al., 2003). Je zřejmé, že tento výčet funkcí IL-6 není kompletní a že mnohé jeho funkce nejsou doposud známy.

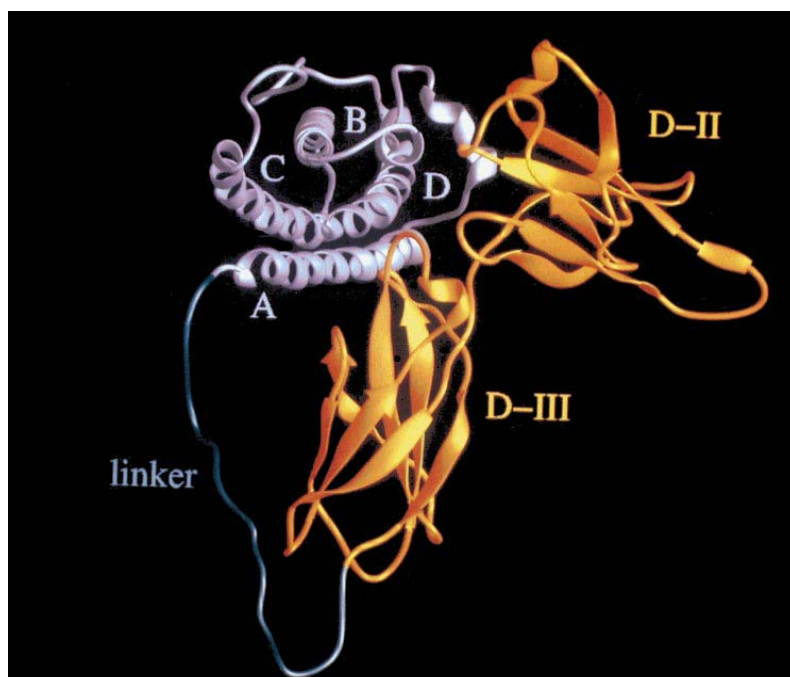
2.4.5. Hyper-IL-6

Efektivní koncentrace IL-6 (50 ng/ml) a sIL-6R (> 1000 ng/ml) (SUI et al., 1995) potřebná pro stimulaci lidských hematopoetických buněk je poměrně vysoká (disociační konstanta (Kd) přitom odpovídá přibližně 10⁻⁹M) (YAMASAKI et al., 1988). Naproti tomu Kd pro vazbu IL-6/sIL-6R na gp130

je značně nižší (10^{-11} M), z čehož lze vyvodit, že životnost komplexu IL-6/IL-6R je příliš krátká na sestavení komplexu IL-6/sIL-6R/gp130. Jinými slovy, komplex IL-6/sIL-6R se často rozpadne mnohem dříve, než stačí dojít k vazbě gp130. Jako výsledek takovýchto úvah byl lidský IL-6 spolu s sIL-6R spojeny do jediné molekuly nazvané „Hyper-IL-6“ (FISCHER et al., 1997).

Hyper-IL-6 se skládá z sIL-6R na N- konci a IL-6 na C-konci (FISCHER et al., 1997). Obě tyto podjednotky přitom kovalentně spojuje 29 flexibilních aminokyselin, netvořících žádnou sekundární strukturu - z toho 16 aminokyselin je součástí N-terminální části IL-6, zbylých 13 aminokyselin bohatých na glycin a serin pochází ze syntetického linkeru. Pro zachování co nejmenší možné velikosti rekombinantního proteinu Hyper-IL-6 byly při jeho produkci použity jen nezbytné části IL-6 a IL-6R. Pro přípravu části IL-6 byla použita sekvence kódující zralý protein, tedy bez signálního peptidu, a část kódující IL-6R byla vytvořena výhradně ze dvou FNIII domén, bez N-terminální Ig domény a bez transmembránové, cytoplasmatické domény (Obrázek 2.10.).

Hyper-IL-6 se ukázal být mnohonásobně účinnějším aktivátorem gp130 oproti IL-6/sIL-6R jak *in vitro*, tak *in vivo*. Efektivní koncentrace Hyper-IL-6 je oproti IL-6/sIL-6R 100 až 1000x nižší (PETERS et al., 1998). Také poločas proteinu Hyper-IL-6 je oproti IL-6 významně delší. To je vysvětlováno především sníženou internalizací Hyper-IL-6 oproti samotnému IL-6 (PETERS et al., 1998). Hyper-IL-6 se tedy stal důležitým nástrojem pro studium transsignalizace s potenciálním terapeutickým významem pro expanzi *ex vivo* hematopoetických progenitorových buněk, pro léčbu a regeneraci jater (např. porucha akutního selhání jater po transplantaci) a pro regeneraci periferních neuronů (HIROTA et al., 1996; PETERS et al., 2000; AUDET et al., 2001; HECHT et al., 2001).



Obrázek 2.10.
Molekulární model lidského rekombinantního proteinu Hyper-IL-6, skládajícího se z IL-6 (fialově), sIL-6R (oranžově) a flexibilního peptidového linkeru (tyrkysově). A, B, C, D označují 4 alfa helixy IL-6. D-II a D-III jsou dvě cytokin vazebné domény (CBM). Zdroj: (FISCHER et al., 1997)

2.5. Kuře - modelový organismus

V naší laboratoři je hojně využívaným modelovým organismem kuře, neboli kur domácí (*Gallus gallus*). Kuře je jedním z osvědčených modelů molekulární a vývojové biologie. Jedná se o ptačího zástupce kmene obratlovců, který je využíván hlavně díky nenákladnému chovu, rychlému vývoji, dlouhé životnosti buněk („life span“) *in vitro*, velkému vajíčku, možnosti *in ovo* technik a v neposlední řadě díky bohatým poznatkům o tomto organismu samotném (STERN, 2005).

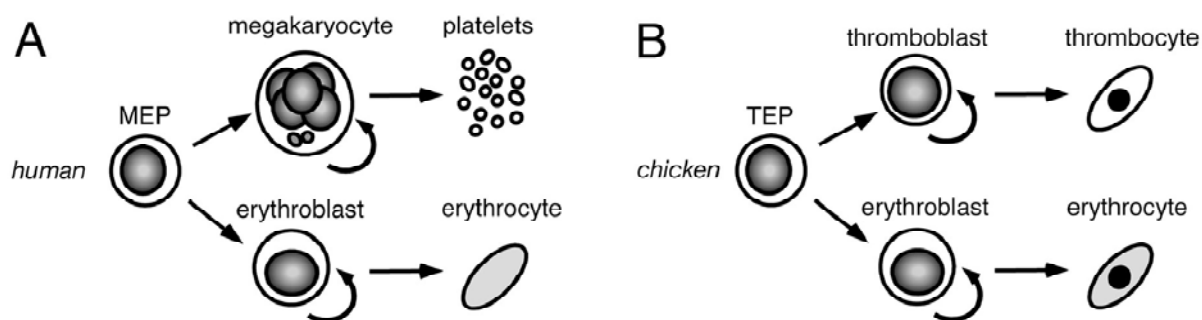
Ačkoli pravé embryonální kmenové buňky (schopné diferenciaci v kterýkoli zárodečný list, včetně zárodečných buněk) byly zatím izolovány pouze u myší, u kuřat se podařilo izolovat buňky podobné. Tyto buňky jsou schopny proliferace po mnoho pasáží a po injikaci do blastodermu jiného zárodku se podílejí na vzniku buněk somatických a s nízkou účinností také zárodečných buněk. K homologní rekombinaci pomocí viru ale u těchto buněk nedochází. Místo toho byl však za účelem produkce transgenního potomstva úspěšně uveden lentivirový systém (STERN, 2005).

V dnešní době již známe celou sekvenci kuřecího genomu a příprava kompletních genomových knihoven je v pokročilé fázi. Kuře je nejhodněji využívaným modelovým organismem z třídy ptáků. Porovnáním kuřecího genomu s genomem savcím či rybím lze zjistit řadu evolučních souvislostí mezi těmito organismy. Předpokládá se, že poslední společný předek savců a ptáků žil před 310-ti miliony let a jednalo se o zástupce z třídy plazů. Z evolučního hlediska se jedná o relativně krátkou dobu, a tak u kuřat můžeme najít řadu konzervovaných genů, které se vyskytují rovněž např. u savců. Mezi tyto geny patří i geny pro různé proteiny, účastníci se nejrozličnějších signálních drah (např. TGF alfa, TGF beta, insulin, atd.).

2.5.1. Ptačí erytro-/trombopoesa

Ptačí hematopoesa se v některých aspektech odlišuje od hematopoesy savců. V první řadě u ptáků nehovoříme o megakaryocytech, nýbrž o tromboplastech a rovněž společný prekurzor trombocytů/erytrocytů je označován jako TEP, místo MEP. U ptačích trombocytů nedochází k jejich endoreduplikaci a rozpadu za vzniku krevních destiček. Dále u ptačích erytrocytů nedochází k enukleaci, a tak jádro v buňce zůstává (nutno však podotknout, že v nefunkčním stavu). Ptačí trombocyty a erytrocyty jsou si tedy fenotypově velmi podobné (jsou oválné, mají podobnou velikost a mají jádro). Rozdíly mezi savčí (lidskou) a ptačí erytro-/megakaryo-/trombopoesou jsou názorně zachyceny na Obrázku 2.11.

Stejně jako u savců, také u kuřat se vyskytuje více druhů různých populací erytroidních progenitorových buněk (EPC). Nejběžnější populace EPC exprimuje c-kit (DOLZNIG et al., 1995; STEINLEIN et al., 1995) a je tzv. SCF dependentní. Prvními dalšími identifikovanými EPC byly TGF alfa dependentní EPC, buňky ve stadiu BFU-E, které mohou být dlouhodobě udržovány v nediferencovaném stavu za přítomnosti TGF alfa (PAIN et al., 1991). Další cytokiny a jejich kombinace spolu se steroidními látkami, které byly použity k získání jiných populací EPC jsou – SCF plus TGF alfa (HAYMAN et al., 1993; STEINLEIN et al., 1995); TGF alfa plus estradiol (SCHROEDER et al., 1993); SCF plus Epo (WESSELY et al., 1999); SCF, TGF alfa plus glukokortikoidy (WESSELY et al., 1997); TGF alfa, TGF beta plus glukokortikoidy (GANDRILLON et al., 1999); bFGF (BARTUNEK et al., 2002).



Obrázek 2.11.

Znázornění (A) lidské a (B) kuřecí diferenciace megakaryocytů/trombocytů a erytrocytů z bi-potentního MEP/TEP progenitorů. Zdroj: (BARTUNEK et al., 2008)

Všechny tyto progenitory jsou za určitých podmínek schopny terminální diferenciace ve zralé erytrocyty, okolnosti diferenciace a jejich vlastnosti se však liší. SCF dependentní progenitorové buňky za přítomnosti SCF po čtyřech až šesti dnech kultivace (od doby izolace z kostní dřeně) bez patřičné stimulace umírají. Naproti tomu SCF/TGF alfa buňky ve stejné době teprve začínají proliferovat a vyznačují se dlouhodobým sebeobnovovacím („self-renewal“) potenciálem (DOLZNIG et al., 1995; STEINLEIN et al., 1995).

EPC získané kultivací buněk kostní dřeně za přítomnosti TGF alfa, TGF beta a glukokortikoidu dexamethasonu jsou označovány jako T2D nebo T2EC buňky (GANDRILLON et al., 1999). Jedná se o EPC mimořádného proliferačního potenciálu, schopné v kultuře přetrvávat po více jak 30 generací. TGF beta tyto buňky vyžadují pouze v prvních deseti dnech svého vývoje, poté je TGF beta syntetizováno autokrinně. T2D buňky jsou independentní na estradiolu, avšak jsou závislé na dexamethasonu. Ten je zpočátku syntetizován autokrinně, po 2 týdnech je však jeho přidání pro přežití buněk nezbytné.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Pro experimentální část diplomové práce byl použit tento materiál:

3.1.1. Prokaryotické buňky

***Escherichia coli* TOP 10** {F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ (araI) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG}. Tento kmen byl pořízen od firmy Invitrogen a jeho hlavní výhodou je rychlá kultivace, snadná izolace plasmidové DNA a možnost modré/bílé selekce na základě komplementace genu lacZ.

***Escherichia coli* BL21 (DE3)-RIL** {B F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal I (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr^R]}. Tyto bakterie ve svém genomu nesou gen pro T7 RNA polymerasu bakteriofága T7 a jsou určeny především pro efektivní expresi genů z T7 promotoru (STUDIER and MOFFATT, 1986).

Prokaryotické a eukaryotické organismy využívají rozdílných translačních aparátů, mimo jiné se mezi sebou liší svými tRNA, a proto další výhodou tohoto kmene (RIL) jsou v genomu integrované geny některých eukaryotických tRNA (arginin, isoleucin a leucin).

3.1.2. Média a živné půdy pro prokaryotické buňky

Kompletní bohatá půda: 1% trypton, 1% kvasničný extrakt, 0,5% casaminoacids, 0,5% glukosa, 84 mM Na₂HPO₄, 16 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂

LB medium: 1% trypton, 1% kvasničný extrakt, 1% NaCl

LB agar: 1,5% agar v LB

3.1.3. Eukaryotické buňky a tkáně

HEK 293 buňky: Tato buněčná linie pochází z lidských embryonálních ledvinových buněk, které byly transformovány modifikovanou DNA adenoviru 5 (GRAHAM et al., 1977). HEK 293 buňky se vyznačují především rychlým růstem a vysokou účinností transfekce.

Ptačí buňky: Jak tkáně pro izolaci RNA, tak buňky kostní dřeně byly získány z kuřat (*Gallus gallus*), kmene Brown Leghorn C/E (HLOŽÁNEK, 1968). Populace T2D buněk byla získána z buněk kostní dřeně po 14-ti dnech kultivace v prostředí SCF a následně v kombinaci TGF alfa, TGF beta a dexamethasonu (GANDRILLON et al., 1999).

sf9, sf21 buňky: Na bakulovirovou expresi proteinů (SUMMERS M.D., 1987; O'REILLY et al., 1992) byly použity hmyzí sf9 a sf21 buňky. Tyto buněčná linie pochází z ovariální tkáně larev *Spodoptera frugiperda*. Buňky sf9 rostou přisedlé a jsou vhodné pro transfekci a plakový test. Naproti tomu buňky sf21 rostou v suspenzi a jsou vhodné pro vlastní produkci rekombinantních proteinů.

3.1.4. Média pro eukaryotické buňky

HEK médium: Médium určené pro kultivaci HEK 293 buněk. Složení - Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s 1 g/l glukosy (Sigma-Aldrich), 10% fetální hovězí sérum, 2 mM glutamin, 100 U/ml penicilin, 0,1 mg/ml streptomycin.

Růstové S13 médium: Médium určené pro růst kuřecích buněk kostní dřeně a erytroidních progenitorových buněk. Složení média (570 ml) – 328 ml Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s 4,5 g/l glukosy (Sigma-Aldrich), 80 ml H₂O, 64 ml 12% fetální telecí sérum (Boehringer), 24 ml 5% kuřecí sérum, 18 ml 20% detoxikované BSA, 18 ml 5,6% NaHCO₃, 4 ml kuřecí transferin (17,5 mg/ml), 64 µl β-merkapt ethanol (1 M), 5 ml penicilin/streptomycin (10x), 10 ml glutamin (200 mM), 8 ml hypoxanthin (2,5 mg/ml), 0,5 ml biotin (0,1 mg/ml), 10 ml směs aminokyselin (10 mM L-Methionin, 20 mM L-Phenylalanin, 10 mM L-Alanin, 50 mM Glycin, 40 mM L-Threonin, 40 mM L-Isoleucin, 10 mM L-Prolin, 40 mM L-Valin, 10 mM L-Kyselina aspartová, 25 mM L-Kyselina glutamová). Po namíchání je médium syceno CO₂ a filtrováno.

Diferenciační S13 médium: Médium určené pro diferenciaci erytrocytů. Kromě nepřítomnosti kuřecího séra je složení totožné s růstovým S13 médiem.

TNM-FH médium (Sigma): Médium pro kultivaci a infekci buněk sf9. Jedná se o optimalizované původní Grace's medium (GRACE, 1962), určené pro růst hmyzích buněk. Do tohoto média se doplňuje 10% fetální hovězí sérum.

Sf-900 II SFM médium (Invitrogen): Médium pro kultivaci a infekci buněk sf21. Toto médium je kompletní a přidává se do něho pouze penicilin a streptomycin.

3.1.5. Vektory a jiné DNA

pBluescript II SK+

Tento vektor (Stratagene) je používán jako klonovací vektor a jeho hlavní výhodou je možnost vysokého namnožení v bakteriální buňce díky tzv. Col E1 origin. Dále tento vektor obsahuje gen pro β-laktamasu, odpovědný za rezistenci transformovaných bakterií vůči ampicilinu, a lacZ' gen. lacZ' gen kóduje α-fragment proteinu pro β-galaktosidasu a je umístěn za lac promotorem, indukovatelným např. laktosovým analogem isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG). Zbytek lacZ genu bývá kódován v bakteriálním genomu (např. zmíněný kmen TOP 10) a tak pokud je do média přidán chromogenní substrát (X-gal), oba fragmenty β-galaktosidasy jsou aktivovány a X-gal je štěpen na modrý produkt. Toho se využívá pro selekci pozitivních klonů nesoucích klonovaný gen. Vložením inzertu do lacZ' kódující sekvence genu dochází k inaktivaci čtecího rámce lacZ' a pozitivní klony jsou proto bílé (Obrázek 3.1.).

pETH2a

Vektor pETH2a poskytl Dr. M. Busslinger (IMP, Vídeň) a jedná se o expresní vektor, který je založen na vektorech série pET (ROSENBERG et al., 1987). Tyto vektory umožňují selektivní transkripci cílové DNA polymerasou T7 bakteriofága z T7 promotoru.

K práci byl použit vektor štěpený restrikcí endonukleasami BamHI, HindIII a 5' defosforylovaný. Stejně jako pBSK SKII+ i tento vektor nese β -laktamasový gen a Col E1 origin. Dále je za start kodonem (ATG), umístěna krátká sekvence, kódující 6 histidinů. Vložením libovolného genu ve čtecím rámci za tuto sekvenci vznikne produkt s modifikovaným N-koncem. Tento produkt je vhodný k detekci anti-His protilátkou a lze jej snadno purifikovat metodou afinitní chromatografie (Obrázek 3.2.).

Bac Vector -3000 Triple Cut Virus DNA

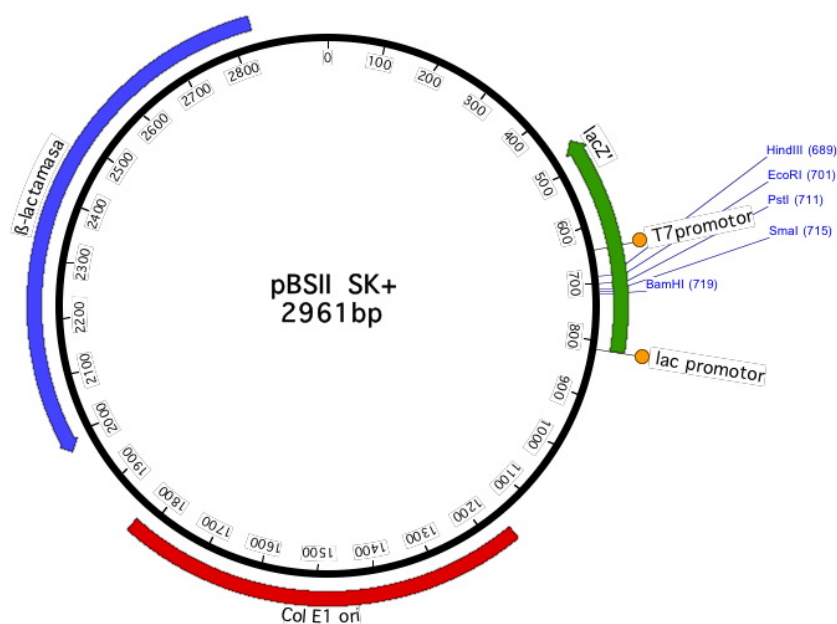
Bac Vector -3000 Triple Cut Virus DNA (Novagen) je modifikovaná DNA bakuloviru *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), která obsahuje letální delecii a nekóduje tak životaschopnou formu viru. Kotransfekcí Bac Vector -3000 Triple Cut Virus DNA s komplementárním bakulovirovým transferovým vektorem dochází k homologní rekombinaci a reverzi letální mutace. Jelikož pouze rekombinantní Bac Vector -3000 Triple Cut Virus DNA produkuje virové potomstvo, účinek rekombinace převyšuje 99%.

pCS2+

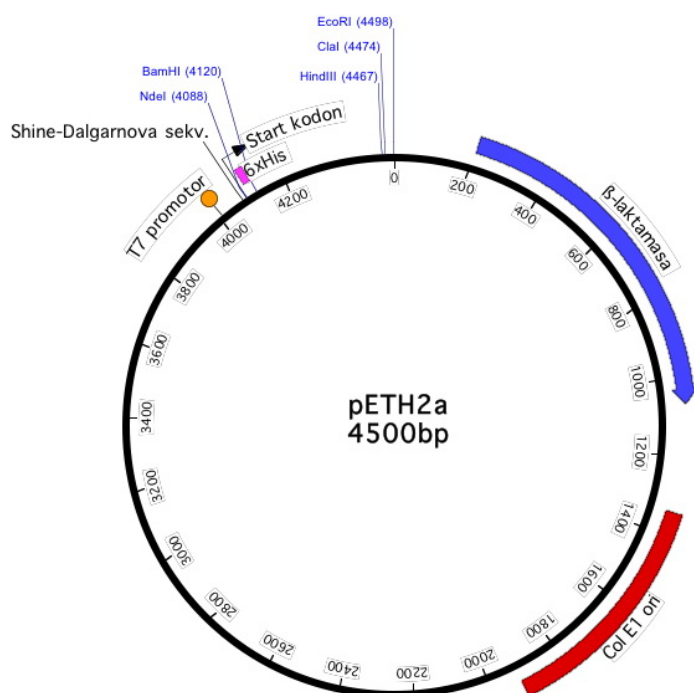
Vektor pCS2+ pochází od Dr. D. Turnera a Dr. R. Ruppa. Jedná se o víceúčelový expresní vektor, primárně určený k expresi proteinů v embryích drápatky a dánía. Tento vektor je však také vhodný k expresi proteinů ze savčích i ptačích buněk a může být použit k *in vitro* transkripci/translaci. Základ vektoru pCS2+ pochází z vektoru pBluescript II KS+ a vektor tudíž obsahuje Col E1 origin a gen pro β -laktamasu. Exprese proteinů je řízena opičím promotorem/enhancerem CMV IE94, následovaným SV40 polyadenylačním signálem. Klonovací kazeta se nachází mezi těmito dvěma sekvencemi. Ve vektoru se nachází rovněž SP6 promoter a v opačné orientaci T7 promoter (Obrázek 3.3.).

pAcGp67-B

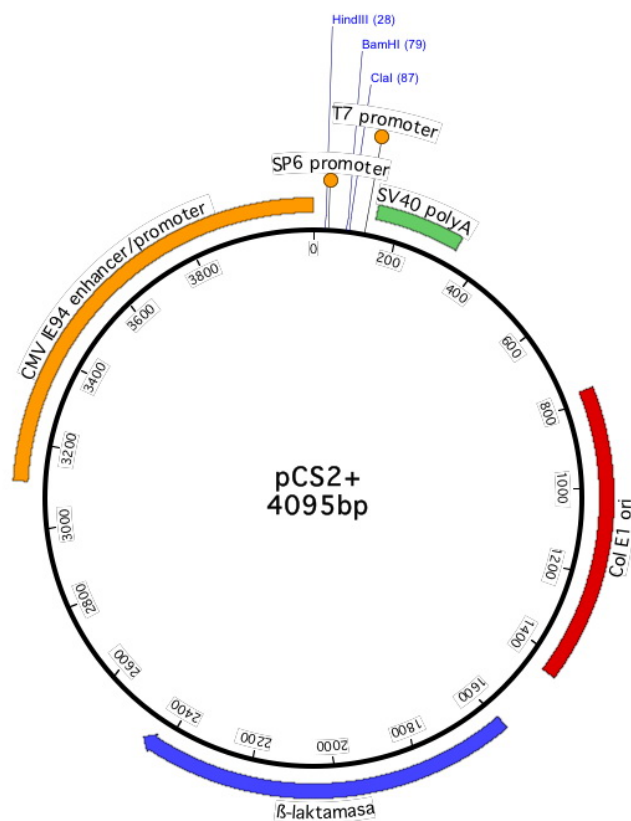
Tento transferový bakulovirový vektor (BD Biosciences Pharmingen) nese gen pro bakulovirový sekreční glykoprotein gp67, za který je možno vkládat libovolný gen. Exprese je řízena z polyhedrinového promotoru, náležící mezi velmi silné a velmi pozdní promotory. Homologní rekombinací tohoto vektoru spolu s Bac Vector -3000 Triple Cut Virus DNA (Novagen) dochází k reverzi letální mutace v ORF 1629 a vzniká tak životaschopné virové potomstvo. Tento vektor obsahuje Col E1 origin a nese β -laktamasový gen, je tedy vhodný k produkci v bakteriích (Obrázek 3.4.).



Obrázek 3.1.
Mapa vektoru pBSII SK+. Inzerty byly vloženy do SmaI nebo BamHI, HindIII restrikčních míst, čímž k inaktivaci genu lacZ'.

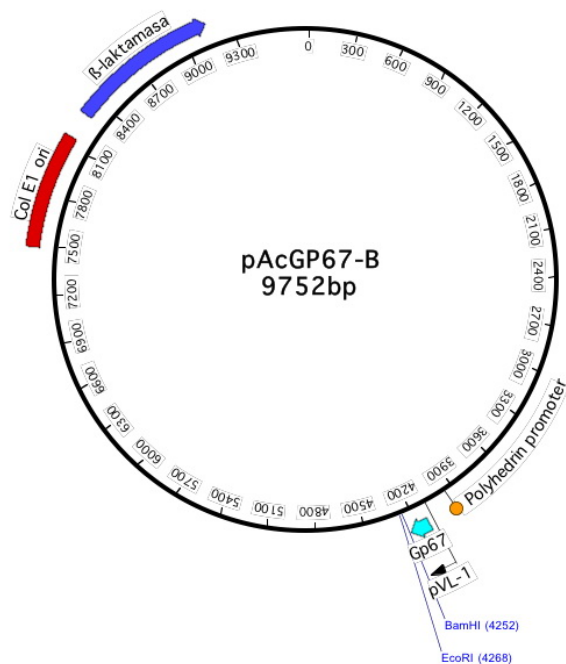


Obrázek 3.2.
Mapa vektoru pETH2a. Inzerty byly vloženy do BamHI, HindIII restrikčních míst.



Obrázek 3.3.

Mapa vektoru pSC2+. Inzerty byly vloženy do vektoru štěpeného enzymy BamHI, ClaI.



Obrázek 3.4.

Mapa vektoru pAcGp67B. Inzerty byly vloženy do BamHI, EcoRI restrikčních míst.

3.1.6. Cytokiny, růstové faktory a hormony

Pro *in vitro* experimenty byly použity kromě IL-6, sIL-6R a Hyper-IL-6 tyto kuřecí růstové faktory: chSCF (BARTUNEK et al., 1996), huTGF alfa (Promega), huTGF beta (Promega), dexamethason (Sigma) a lidský rekombinantní insulin Actrapid (NovoNordisk).

3.1.7. Enzymy

Všechny použité enzymy pochází od firem Promega, New England Biolabs (NEB), Boehringer Ingelheim, Roche, Finnzymes, Pharmacia, Amersham, Fermentas, Invitrogen a Stratagene.

3.1.8. Oligonukleotidy

Oligonukleotidy IL-6-1, IL-6-2, IL-6R-1, IL-6R-2, LinkerIL-6-1, LinkerIL-6-2, His-hIL-6-Leader-1, His-hIL-6-Leader-2, His-hIL-6-Leader-3 a His-hIL-6-Leader-4 (jednotlivé sekvence viz. Appendix 8.1.) byly syntetizovány firmou Metabion.

3.1.9. Protilátky

Monoclonal anti-polyHistidine, Peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich): Myší monoklonální protilátka proti motivu 6-His s konjugovanou křenovou peroxidasou. Protilátka se používá v koncentraci 1:2000.

3.1.10. Soupravy pro molekulární biologii

ECL™ (Amersham): Tato souprava pro detekci bílkovin pomocí protilátek obsahuje sekundární protilátky s kovalentně navázanou peroxidasou, rozeznávající králíčí nebo myší primární protilátky, a roztoky se substrátem a katalyzátory pro ECL (enhanced chemiluminescence) reakci. Peroxidasa štěpí peroxid vodíku, čímž vznikají volné radikály. Tyto radikály reagují s kumarovou kyselinou a dochází k luminiscenci.

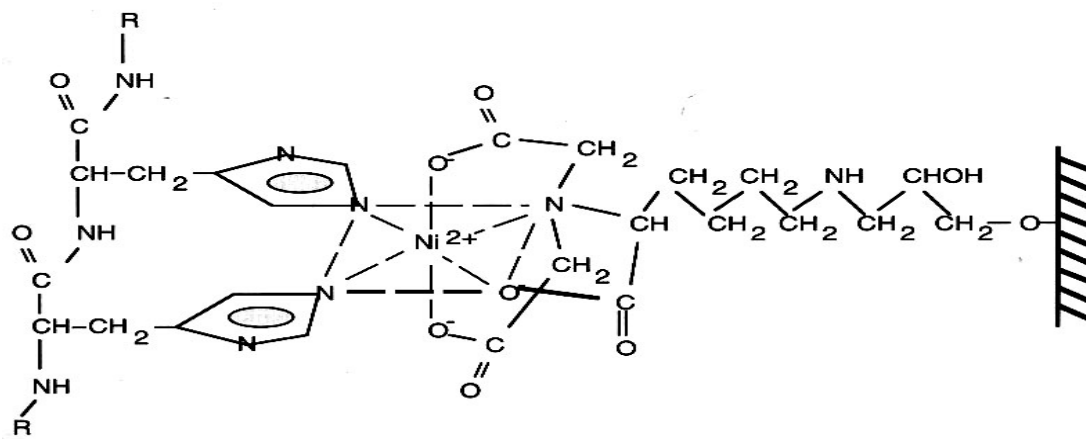
Sekvenační souprava Big Dye™ (Applied Biosystems – Perkin Elmer): Tento kit slouží k sekvenaci DNA dideoxy terminační metodou. Barva Big Dye obsahuje DNA polymerasu, pufr, prekursor nukleotidů (dNTP) a dideoxynukleotidy (ddNTP), které jsou označeny různými fluorescenčními barvami. Dideoxynukleotidy mohou být s určitou pravděpodobností inkorporovány do vznikajícího vlákna DNA a po inkorporaci terminují polymerační reakci. Tímto způsobem vznikne mnoho různě dlouhých fragmentů, které jsou na 3' konci označeny jedním ze čtyř fluoroforů. DNA sekvence je určena podle elektroforetického rozdělení těchto fragmentů.

TnT kit® (Promega): Kit pro *in vitro* transkripci/translaci slouží mimo jiné pro ověření nepoškozeného čtecího rámce (ORF). Součástí kitu je též T7 RNA polymerasa, lyzát z králíčích retikulocytů a směs aminokyselin. Z vhodného vektoru je během jednoho kroku přepsána mRNA, která je následně translatována. Během translace je do proteinu inkorporován 35S-methionin. Značené proteiny jsou separovány pomocí SDS-PAGE a autoradiograficky detekovány.

Bradford Reagent (Bio-Rad): Roztok podle Bradfordové pro kvantitativní stanovení proteinů obsahující Coomassie Brilliant Blue G 250 (BRADFORD, 1976).

3.1.11. Materiál pro afinitní chromatografii

Pro purifikaci proteinů byla použita speciální agarosa (Qiagen), obsahující kovalentně navázané ionty Ni^{2+} (Ni^{2+} -NTA agarosa). Proteiny obsahující sekvenci šesti až desíti histidinů jsou schopny se s vysokou afinitou na tyto konjugáty vázat a tím mohou být separovány. (HOCHULI, 1988) (Obrázek 3.5.).



Obrázek 3.5.

Model vazby Ni^{2+} -NTA agarosy na skupinu sousedících histidinů. Zdroj: Qiagen, The QIAexpressionist, May 1991.

3.1.12. Roztoky a pufry

3.1.12.1. Pufry a další chemikálie pro práci s nukleovými kyselinami

TEG: 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM glukosa

0,5x TE: 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 8,0

TE + RNasa: 50 µg ribonukleazy A v 1 ml 0,5xTE

1x PBS: 150 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

SDS-NaOH: 1% SDS, 0,2 M NaOH

Pufr pro lýzu bakulovirových partikulí: 10 mM TrisHCl pH 7,6, 10 mM EDTA, 0,25 % SDS

Fenol-chloroform: Objemový poměr 1:1. Fenol ekvilibrován 0,1 M Tris pH 8,0

1x TBE: 89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA, pH 8,3

Agarosový gel (1 - 2%): 0,5 - 1 g agarosu v 50 ml TBE + 0,5 µg/ml ethidium bromid

10x BFB: 500 µl glycerolu, 200 µl 0,5M EDTA, 50 µl 1M Tris pH 8, 250 µl H₂O, 1% bromfenolová modř

TSR (Template Supression Reagent): denaturační pufr obsahující formamid (Applied Biosystems-Perkin Elmer)

3.1.12.2. Pufry pro proteinovou elektroforézu za denaturujících podmínek (SDS-PAGE)

5x vzorkový (lyzační) pufr: 60 mM Tris pH 6,8, 25% glycerol, 2% SDS, 14,4 mM 2-merka-ptoethanol, 0,1% bromfenolová modř

Separační gel: 10-15% akrylamid (+ N, N'-metylenbisakrylamid, 75AA:2BIS), 375 mM Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfát amonný, 0,07% TEMED (N,N,N',N' - tetramethyl-ethylendiamin)

Zaostřovací gel: 5% akrylamid (+ N, N'-metylenbisakrylamid), 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,075% persulfát amonný, 0,1% TEMED

Pufr pro SDS-PAGE: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS; pH 8,3

3.1.12.3. Pufry pro přenos bílkovin na membránu a specifickou detekci bílkovin („Western-blotting“)

Přenášecí pufr: 20 mM Tris, 153,6 mM glycin, 20% methanol; pH 8,3

PBST: 1x PBS, 0,05% Tween 20

Blokovací roztok: 5% odtučněné sušené mléko v 1x PBS

3.1.12.4. Pufry pro afinitní chromatografii za denaturujících podmínek

Pufr A: 6 M guanidine hydrochloride, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-merka-ptoethanol; pH 8,0

Pufr B: 8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-merkaptotoethanol; pH 8,0

Pufr B: 8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-merkaptotoethanol; pH 6,3

Pufr E: 8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-merkaptotoethanol; pH 4,5

Dialyzační pufry: PBS nebo 25 mM HEPES pH7,5

3.1.12.5. Pufry pro afinitní chromatografii za nativních podmínek

Pufr B: 100 mM imidazol, 1,5 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄

Pufr W: 50 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄

Pufr E: 200 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄

3.1.12.6. Roztoky na hemoglobinový test

Hemoglobinové činidlo: 0,5 mg/ml o-phenylenediamin dihydrochlorid v 0,1 M citrátovém/fosfatovém pufru (pH 5,0), 1 μl 30% H₂O₂

Citrátový/fosfatový pufr: 0,1 M kyselina citrónová, 0,1 M Na₂HPO₄, pH 5,0

STOP roztok: 1 ml H₂SO₄, 3,5 ml H₂O

3.2. Metody

3.2.1. Práce s nukleovými kyselinami

3.2.1.1. Izolace RNA

Po odběru tkáně byl materiál homogenizován a zpracován v reagentu TRIzol (Invitrogen) (CHOMCZYNSKI and SACCHI, 1987). Tento roztok obsahuje kromě fenolu guanidin isothiokyanát (kyselé pH). Během homogenizace buněk TRIzol udržuje integritu RNA, zatímco rozrušuje buňky a jednotlivé buněčné kompartmenty. RNA po centrifugaci zůstala ve vodné fázi a byla vysrážena isopropanolem. Na závěr byla spektrofotometricky stanovena její koncentrace a kvalita.

3.2.1.2. Syntéza 1. vlákna cDNA (complementary DNA)

Metodou reverzní transkripce bylo syntetizováno 1.vlákno cDNA. Reakce byla namíchána v následujícím poměru:

RNA	5 µg
5x M-MuLV-buffer	5 µl
10 mM dNTP	3 µl
0,5 M p(dN) ₆	0,5 µl
RNasin Ribonuclease Inhibitor (40u/µl)	1 µl
M-MuLV reverse transcriptasa	1 µl (200 U)
H ₂ O	doplnit do 25 µl

Nejprve byly namíchány veškeré komponenty (premix), kromě p(dN)₆ a RNA, poté byly jednotlivé složky v tomto pořadí smíchány:

1.	RNA+H ₂ O (celkem 11 µl)	5 min 68°C, led
2.	+0,5 µl p(dN) ₆	5 min 68°C, led
3.	+premix (13,5 µl)	1 h 37°C, 10 min 95°C

Takto připravená cDNA může být skladována v -20°C/ -80°C.

3.2.1.3. PCR

Pro polymerasovou řetězovou reakci byla použita Taq polymerasa (NEB) nebo polymerasa Phusion™ (Finnzymes), v případě amplifikace náročných templátů s vysokým obsahem GC nukleotidů.

Reagencie byly namíchány na ledu dle následujícího vzoru:

DNA templát	cca. 0,5µg	} premix
10x Taq (5x Phusion™ HF nebo GC) buffer	5 µl	
10 mM dNTP	5 µl	
50 µM primers	0,25 µl (každý)	
Taq (Phusion™) polymerase	0,25 µl (0,5 U)	
H ₂ O	doplnit do 25 µl	

Vlastní amplifikace proběhla na termocycleru XP cycler (Bioer) podle následujícího programu:

Děj	Teplota	Doba trvání	
Počáteční denaturace	98°C	1 min, 30 s	
Denaturace	98°C	30 s	} 36x
Anelace	55 - 65°C	30 s	
Elongace	72°C	30 s	
Dokončení elongace	72°C	5 min	

Rychlá identifikace bakteriálních klonů nesoucích plasmid s vloženým inzertem pomocí PCR („PCR-screening“)

Tato metoda byla použita k rychlé a spolehlivé identifikaci pozitivních bakteriálních kolonií v případě, že byla během ligace nízká účinnost vnášení inzertu do plasmidu. Bakteriální kolonie narostlé na plotně jsou resuspendovány v malém množství vody a během tepelné lýzy při vlastní PCR dojde k uvolnění DNA a následné amplifikaci. Na toto PCR byla použita kombinace primerů, ve které první primer nasedal na vektor a druhý primer nasedal do oblasti inzertu. Takto byly rychle a spolehlivě identifikovány pozitivní klony včetně jejich orientace.

Kolonie byla špičkou přenesena do mikrozkušavky a resuspendována v 5-ti μl H_2O , z toho 0,1 μl pak bylo přeneseno na novou plotnu („replica plate“) a ke zbytku byl přidán premix. PCR dále probíhalo standardním způsobem.

3.2.1.4. Sekvenace

Sekvence klonovaných nukleových kyselin byly v průběhu práce kontrolovány a ověřovány pomocí sekvenačního kapilárního přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer vybaveného softwarem pro analýzu dat ABI PRISM 310 Collection (Perkin Elmer). DNA byla před vlastní sekvenací přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí a zbavena tak veškeré kontaminující RNA a proteinů. Nakonec byla spektrofotometricky stanovena její koncentrace. Sekvenační reakce byla namíchána pomocí komerční soupravy Big Dye™ následujícím způsobem:

DNA template	1 μg
Primer	1 pmol
Premix (BigDyeTerminator)	2 μl
H_2O	doplnit do 10 μl

Reakce byla připravena na ledu a zkumavka poté vložena do termocycleru, kde byl spuštěn následující program:

Děj	Teplota	Doba trvání	
Počáteční denaturace	96°C	1 min	
Denaturace	96°C	20 s	} 24x
Anelace	45-60°C	5 s	
Elongace	60°C	4 min	

Po ukončení bylo k obsahu zkumavek přidáno: 10 μl 3 M NaAc, 80 μl H_2O , 1 μg glykogenu a 270 μl 96%EtOH. Zkumavka byla centrifugována při 4°C 15 min na stolní centrifuze při 14000 rpm.

Pelet byl opláchnut v 500 µl 70% ethanolu, 2 min centrifugován při 14000 rpm, vysušen a rozpuštěn ve 25 µl TSR. Poté byla DNA 5 min denaturován při 95°C a přenesena do sekvenačního přístroje.

3.2.1.5. Purifikace DNA – odstranění proteinů (fenol-chloroformová extrakce)

Roztok DNA (obvykle po enzymatických reakcích jako je štěpení restrikčními endonukleasami, či štěpení RNA ribonukleasou A) byl doplněn 90 µl H₂O. Ke směsi bylo přidáno 15 µl 5M NaAc pH 7, vše bylo promícháno a dále bylo přidáno 100 µl fenol-chloroformu. Po intenzivním protřepání a centrifugaci 3 min při 14000 rpm byla odebrána vodná fáze, ke které bylo přidáno 100 µl chloroformu. Zkumavka byla promíchána na vortexu a centrifugována stejně jako v předchozím kroku. Po přidání 250 µl 96% ethanolu a protřepání byla směs inkubována 2 min při laboratorní teplotě a následně centrifugována 5 min při 14000 rpm. Pelet byl opláchnut 70% ethanol, vysušen a rozpuštěn v 15 µl 0,5x TE.

3.2.1.6. Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou Analytická izolace („Miniprep“)

Plasmidová DNA byla izolována z 1,5 ml bakteriální kultury TOP 10 nebo BL21 (DE3)-RIL pěstované 12 hodin na orbitálním inkubátoru při 37°C a 200-250 rpm. Bakterie byly pěstovány v LB mediu s ampicilinem o koncentraci 0,1 mg/ml. Bakteriální pelet vzniklý centrifugací buněk ve stolní centrifuzě (2 min, 14000 rpm) byl resuspendován v 50 µl TEG a promíchán na vortexu. Poté bylo přidáno 50 µl denaturačního roztoku (2% SDS a 0,2M NaOH) a směs byla opět promíchána na vortexu. Po přidání 50 µl neutralizačního roztoku (3MK 5MAc) a po intenzivním protřepání byla směs inkubována 2 min při laboratorní teplotě, poté byla doplněna 150 µl fenol-chloroformu, intenzivně promíchána na vortexu a centrifugována 3 min při 14000 rpm. Supernatant byl přenesen do nových zkumavek, doplněn 0,7x objemem isopropanolu, promíchán na vortexu, ponechán 2 min při laboratorní teplotě a následně centrifugován 3 min při 14000 rpm. Pelet byl po centrifugaci opláchnut 70% ethanol, vysušen, resuspendován v 25 µl TE RNasa a inkubován 2h při 37°C. Pro analytické restrikční štěpení bylo obvykle použito 5 µl této směsi.

Preparativní izolace („Midiprep“)

50 ml bakteriální suspenze narostlé přes noc v LB mediu bylo centrifugováno v laboratorní centrifuzě Heraeus při 4°C, 10 min a 4500 rpm. Poté byl pelet resuspendován ve 2 ml pufru TEG a bylo přidáno 8 ml SDS-NaOH roztoku. Po opatrném promíchání byla směs inkubována 10 min při laboratorní teplotě a pak ochlazená na led. Následně bylo přidáno 6 ml 10M octanu amonného, promícháno a ponecháno 10 min při 0°C. K suspenzi ve zkumavce bylo přidáno 0,5 ml fenol/chloroformu, zkumavka byla intenzivně promíchána pomocí vortexu a centrifugována 10 min při 4500 rpm. Supernatant byl pečlivě odpipetován do čisté zkumavky a bylo k němu přidáno 7 ml isopropanolu. Vše bylo promícháno a inkubováno 5 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovalo 15 min centrifugace při 4500 rpm a 4°C. Sediment byl rozpuštěn v 0,3 ml 0,5x TE a bylo přidáno 100 µl 10M LiCl, promícháno na vortexu a po 10 min inkubaci na ledu proběhla

centrifugace 5 min při 14000 rpm. K odebranému supernatantu bylo přidáno 250 μ l isopropanolu a vše bylo po promíchání zcentrifugováno 5 min při 14000 rpm. Sediment byl opláchnut 500 μ l 80% ethanolu, usušen při 50°C, rozpuštěn v 100 μ l TE+RNasa a inkubován 2 hodiny při 37°C.

Po ukončení inkubace bylo přidáno 160 μ l 0,5 \times TE, 40 μ l 5M NaAc pH 7,0 a 400 μ l fenol/chloroformu. Vzorek byl intenzivně promíchán a centrifugován 5 min při 14000 rpm. K odebrané horní fázi byl přidán 1 ml 96% ethanolu, vše bylo promícháno na vortexu a inkubováno 10 min při laboratorní teplotě. Precipitovaná DNA byla centrifugována při 14000 rpm po dobu 5 min. Sediment byl opláchnut dvakrát 500 μ l 80% ethanolu, usušen při 50°C a rozpuštěn v 500 ml 0,5 \times TE.

U takto zpracované plasmidové DNA byly spektrofotometricky stanoveny hodnoty absorbance při 230, 260 a 280 nm vypovídající o kvalitě preparátu a o koncentraci DNA.

3.2.1.7. Štěpení restrikčními endonukleasami

Pro analytické účely bylo štěpení prováděno v 10 μ l celkového objemu restrikční směsi. Na štěpení 1 μ g DNA byly použity 2 U enzymu. Do reakce byl přidán 1 μ l 10 \times koncentrovaného pufru, obsahující hlavně hořečnaté a jiné dvojmocné kationty, které jsou nezbytné pro vlastní enzymatickou reakci.

Pro preparativní účely byl objem reakční směsi zvětšován dle množství štěpené DNA. Teplota použitá při inkubaci a typ pufru odpovídaly doporučením výrobců daných enzymů. Doba štěpení se pohybovala v rozmezí 1-12 hodin.

3.2.1.8. Ligace

Výsledný objem ligační směsi byl 15 μ l, ojediněle 150 μ l. Směs obsahovala 1 μ l T4 DNA ligasy (New England Biolabs, 10 U/ μ l) a 1 μ l 10 \times koncentrovaného ligačního pufru (NEB), obsahující kromě různých iontů také ATP, coby substrát energie pro ligasu.

Množství a molární poměr vektoru a inzertu se u jednotlivých reakcí lišily, obecně byl dodržován přibližně 10-ti molární přebytek inzertu oproti vektoru. Ligace přecházejících konců probíhala jednu hodinu při laboratorní teplotě, ligace tupých konců pak přes noc při 16°C.

3.2.1.9. *In vitro* transkripce a translace

Tato metoda byla použita pro ověření funkčního čtecího rámce exprimovaných proteinů. Použitý TnT kit (Promega) má výhodu, že transkripce a translace probíhají za sebou v rámci jedné reakce, což snižuje riziko kontaminace RNasami. Reagencie byly namíchaný na ledu do mikrozkušavky dle následující tabulky:

TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate	25 µl
TNT® Reaction Buffer	2 µl
TNT® T7 RNA Polymerase	1 µl
Amino Acid Mixture, Minus Methionine, 1mM	1 µl
[35S]methionine (>1,000Ci/mmol at 10mCi/ml)	2 µl
RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40u/µl)	1 µl
DNA template	0,5 µg
H ₂ O	doplnit do 50 µl

Reakce byla inkubována při 30°C po dobu 90 min a 15 µl bylo separováno pomocí SDS-PAGE. Gel byl poté usušen a značené proteiny byly autoradiograficky detekovány (viz. dále).

3.2.1.10. Elektroforéza nukleových kyselin v agarosovém gelu

Elektroforéza byla prováděna v horizontálním uspořádání v agarosovém gelu. Pro analytické účely byla použita obyčejná agarosa, pro účely preparativní nízkotající agarosa NuSieve (FMC Bioproducts). Agarosový gel byl připraven krátkým povařením agarosy v 60 ml 1xTBE pufru. Hustota gelu se pohybovala v rozmezí 1 – 2,5%, v závislosti na velikosti dělených fragmentů. Po povaření a úplném rozpuštění agarosy v pufru byl přidán ethidium bromid v množství 0,5 µg/ml, umožňující vizualizovat přítomnou DNA v UV světle. K nanášeným vzorkům byl přidán 10x BFB pufr. Elektroforéza trvala 60-90 minut při laboratorní teplotě s vloženým napětím 5-10 V/cm.

3.2.1.11. Izolace fragmentu z agarosového gelu

Po elektroforetické separaci fragmentů nukleových kyselin v nízkotajícím agarosovém gelu byla část gelu, obsahující požadovaný fragment, vyříznuta skalpelem a přenesena do centrifugační mikrozkušavky. Do této zkušavky bylo přidáno 500 µl 0,5x TE pufru a během 10 min při teplotě 68°C došlo k úplnému rozpuštění agarosy. Směs byla krátce míchána na vortexu a k takto získanému roztoku bylo přidáno 0,5 ml fenolu. Po důkladném protřepání a centrifugaci (3 min 14000 rpm) byla do nové zkušavky odebrána vodná fáze a bylo přidáno 0,5ml směsi fenol-chloroform. Směs byla opětovně míchána na vortexu a centrifugována jako v předchozím kroku a po odebrání vodné fáze bylo přidáno 0,5 ml chloroformu, 1 µg glykogenu a 50 µl NaAc. Po protřepání a centrifugaci (3 min 14000 rpm) byl k vodné fázi přidán 1 ml 96% ethanolu. Zkušavka byla 10 min centrifugována při 14000 rpm a 4°C. Pelet byl poté 2x opláchnut 70% ethanolem, vysušen a rozpuštěn v 10 µl TE.

3.2.1.12. Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin

Měření absorbance bylo provedeno v křemíkové kyvetě na přístroji SpectraMax (Molecular Devices) nebo v přístroji Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) a byly měřeny absorbance při 230, 260 a 280 nm. Použité koeficienty pro hodnocení kvality a kvantity dvouřetězcové DNA byly následující:

- $A(260)=1$ odpovídá koncentraci 50 µg/ml čisté dvouřetězcové DNA nebo 40 µg/ml jednořetězcové RNA, ve vodném roztoku
- $A(260nm)/A(280nm)=1,8$; pokud je nižší, obsahuje preparát zbytky proteinů

- $A(260\text{nm})/A(230\text{nm})=2,2$; pokud je nižší, obsahuje preparát zbytky aromatických sloučenin, pravděpodobně stopy fenolu

3.2.2. Práce s proteiny

3.2.2.1. Exprese proteinů v bakteriích *Escherichia coli*

Transformační zkumavka(y) s 1 ml LB media a ampicilinem o koncentraci 0,1 mg/ml byly inokulovány bakteriální kolonií nebo bakteriemi z konzervy (bakteriální suspenze v 50% glycerolu zamražená na -80°C) kmene BL21 (DE3)-RIL, nesoucí příslušný expresní plasmid. Bakterie byly kultivovány na orbitálním inkubátoru při 37°C a 250 rpm po dobu 12 hodin. Poté bylo odebráno 50-200 μl , kterými byla inokulována 50 ml zkumavka (Falcon) s 10 ml LB media a ampicilinem (0,1mg/ml). Kultivace probíhala na orbitálním inkubátoru (250 rpm) při 37°C . Během této kultivace byla průběžně měřena optická denzita kultury při 600 nm. Ve chvíli, kdy absorbance dosáhla hodnoty OD 0,6, byl odebrán 1ml alikvot, který později sloužil jako neindukovaná kontrola (-) a ke zbytku bylo přidáno 10 μl 1M IPTG. Kultivace dále pokračovala stejným způsobem další 2 hodiny. Na konci byl ze zbylých 9ml odebrán další 1ml alikvot (+) a zbytek byl centrifugován na centrifuze Heraeus (15 min, 4600 rpm).

Alikvoty (-) a (+) byly centrifugovány (1min, 14000rpm) a resuspendovány v lyzačním pufru. Poté byly po dobu 5-ti minut povařeny v 95°C a zamraženy v -20°C .

3.2.2.2. Proteinová elektroforéza za denaturačních podmínek

Proteinové vzorky byly analyzovány SDS polyakrylamidovou elektroforézou za denaturujících podmínek (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Tato metoda umožňuje dělení proteinů v závislosti na velikosti, což ve většině případů odpovídá dělení podle molekulové hmotnosti. Prováděna byla na aparatuře Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System (Bio Rad). Deskové gely měly rozměry 8,6 x 6,8mm a tloušťku 0,75 nebo 1 mm. Používán byl 12 - 15% dělicí gel, zaostřovací gel byl vždy 5%. Před vlastní separací byly vzorky 5 min denaturovány při 95°C . Elektroforéza probíhala při laboratorní teplotě za konstantního proudu 20mA na jeden gel.

3.2.2.3. Imunodetekce bílkovin („Western blotting“)

Pro identifikaci proteinů rozdělených na SDS polyakrylamidovém gelu bylo po jejich přenosu na nitrocelulosovou membránu využito specifické detekce protilátkami (BURNETTE, 1981), Western blotting. Elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu byl prováděn na přístroji TE77XP Semi-Dry Transfer Unit (Hoefer). Nitrocelulosová membrána byla s gelem a s filtračními papíry (Whatman) inkubována 5 min v přenášecím pufru a vložena mezi 2x4 filtrační papíry (stejných rozměrů jako membrána a gel) a dvě deskové uhlíkové elektrody blotéru. Ze „sendviče“ byly odstraněny bubliny a byl aplikován konstantní proud $2,5\text{ mAcm}^{-2}$ po dobu 1,5 hodiny. Celý postup probíhal při laboratorní teplotě.

Po přenosu proteinů na nitrocelulosovou membránu byla vazebná místa na membráně vysycena blokovacím roztokem (5% mléko) po dobu 12 hodin. Poté byla membrána 3x promyta

v PBST a inkubována 2 hodiny s anti-His protilátkou v PBST pufru a 1% BSA. Tato protilátka je konjugovaná s křenovou peroxidasou, a tak není potřeba používat sekundární protilátku. Po sedminásobném opláchnutí v PBST byla membrána inkubována 5 min s roztoky ECL 1 a 2 obsahující luminol a peroxid vodíku. Výsledná chemiluminiscence byla zaznamenána na rentgenový film (Foma) a ten byl vyvolán přístrojem Optimax Automatic X-Ray Film Processor (Protec).

3.2.2.4. Purifikace proteinu metodou afinitní chromatografie pomocí Ni^{2+} -NTA agarosy

Proteiny s 6-ti histidiny na N-konci byly purifikovány jedním z protokolů firmy Qiagen.

Purifikace proteinů za denaturujících podmínek

Bakteriální pelet (8 ml) byl resuspendován v 1 ml pufru A. Směs byla poté krátce promíchána na vortexu a ponechána po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Dále byla směs centrifugována (5 min, 14000 rpm) a byl odebrán supernatant, ke kterému bylo přidáno 50 μl Ni^{2+} -NTA agarosy 2x promyté v pufru A. Obsah zkumavky byl inkubován za pomalého otáčení (10 rpm) po dobu 40 min při laboratorní teplotě. V tomto kroku se his-tagované proteiny navázaly na Ni^{2+} -NTA agarosu.

Následně byla směs centrifugována (5 min, 6000 rpm) a pelet byl postupně opláchnut těmito pufrů: znova 1x pufr A (1 ml), dále 1x pufr B (1 ml), 2x pufr C (po 1 ml) a nakonec byl protein v kolonce eluován 500 μl pufru E. Mezi jednotlivými promývacími kroky byla směs pokaždé krátce centrifugována a supernatant byl uschován.

Koncentrace proteinu byla stanovena metodou podle Bradfordové (BRADFORD, 1976) a protein byl přenesen do dialyzační membrány, kde byl 12 hodin dialyzován proti 1xPBS nebo HEPES (pH7,5).

Purifikace proteinů v supernatantu za nativních podmínek

Po odebrání 1 ml supernatantu byl supernatant centrifugován (10 min, 14000 rpm, 4°C), aby došlo k odstranění buněčných zbytků. Poté bylo přidáno 100 μl pufru B a 10 μl Ni^{2+} -NTA agarosy 2x promyté v pufru W. Směs byla inkubována za pomalého otáčení (10 rpm) po dobu 60 min při 4°C. Během této doby se his-tagované proteiny navázaly na Ni^{2+} -NTA agarosu a poté byla směs 3x centrifugována (5 min, 6000 rpm, 4°C) a pelet byl pokaždé opláchnut pufr W (1 ml). Nakonec byl pelet 3x po sobě eluován ve vsádce pomocí 25 μl pufru E. Mezi jednotlivými elucemi byla směs vždy centrifugována (5 min, 6000 rpm, 4°C). Eluce byly uchovány při 4°C a analyzovány metodou „Western blotting“.

3.2.2.5. Kvantifikace proteinů podle Bradfordové

Ke kvantitativnímu stanovení proteinů byla použita metoda podle Bradfordové. Roztok určený ke kvantifikaci obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue G 250, které v přítomnosti proteinů (aminokyselin s aromatickými postranními řetězci) posunuje absorpční maximum ze 465 nm na 595 nm. Jako standard byly použity roztoky obsahující různé koncentrace BSA.

100 μl zásobního roztoku bylo odměřeno do několika jamek v mikrotitrační destičce a do těchto jamek byly přidány po 5 μl měřené vzorky včetně standardů s jednotlivými koncentracemi

BSA. Následovala 5-ti minutová inkubace při laboratorní teplotě a poté byla změřena absorbance při 595 nm. Koncentrace byla stanovena na základě kalibrační křivky BSA.

3.2.3. Práce s buňkami

3.2.3.1. Transformace bakterií tepelným šokem

100 μ l čerstvě rozmražené suspenze transformačně kompetentních bakterií *Escherichia coli* kmene TOP 10 nebo BL21 (DE3)-RIL bylo přidáno k 10 μ l ligační směsi a suspenze byla přenesena do transformační zkumavky. Po inkubaci na ledu byly buňky vloženy na 1 min do vodní lázně s teplotou 42°C (tepelný šok). Poté byly ochlazeny na ledu a po přidání 0,9 ml LB media byly inkubovány za stálého třepání 40 min v 37°C. Po uplynutí této doby byly bakterie přeneseny do mikrozkuavky, lehce centrifugovány na stolní centrifuze (4000 rpm, 1 min) a pelet byl resuspendován v 100-200 μ l LB media. Sterilní skleněnou tyčkou („hokejka“) byla suspenze rozetřena na agarovou plotnu (průměr 10 cm) obsahující antibiotikum ampicilin. Pokud byla prováděna modrá/bílá selekce, bylo na plotny před rozetřením přidáno 10 μ l 100 mM IPTG a 40 μ l chromogenního substrátu 2% X-gal. Poté byly buňky na plotně inkubovány 12-16 hodin při 37°C.

3.2.3.2. Transientní transfekce buněk HEK 293 a produkce rekombinantních proteinů

Den před plánovanou transfekcí bylo na 6 cm misku vyseto 5×10^5 buněk HEK 293. Po 24 hodinách byla ověřena hustota narostlých buněk pod mikroskopem, vyměněno HEK médium za DMEM a byly připraveny následující roztoky:

- Roztok A: 275 μ l 150 mM NaCl a 10 μ g transfekovaného vektoru
- Roztok B: 242 μ l 150 mM NaCl a 33 μ l polyethylenimin (PEI)

Oba roztoky, byly intenzivně promíchány na vortexu a inkubovány 15 min při laboratorní teplotě. Následně byly oba roztoky pomalu smíchány, opět promíchány na vortexu a inkubovány 10 min při laboratorní teplotě. Dále byl tento roztok pomalu nakapán k buňkám a buňky byly inkubovány 4 hodiny při 37°C, v atmosféře obsahující 5% CO₂. Po uplynutí této doby bylo médium odsáto a vyměněno za standardní HEK médium. Buňky byly kultivovány 72 hodin. Během této doby došlo k produkci a sekreci požadovaných proteinů. Nakonec bylo médium odebráno, centrifugováno (10000 rpm, 10 min, 4°C) a supernatanty byly uchovány při 4°C pro následné použití.

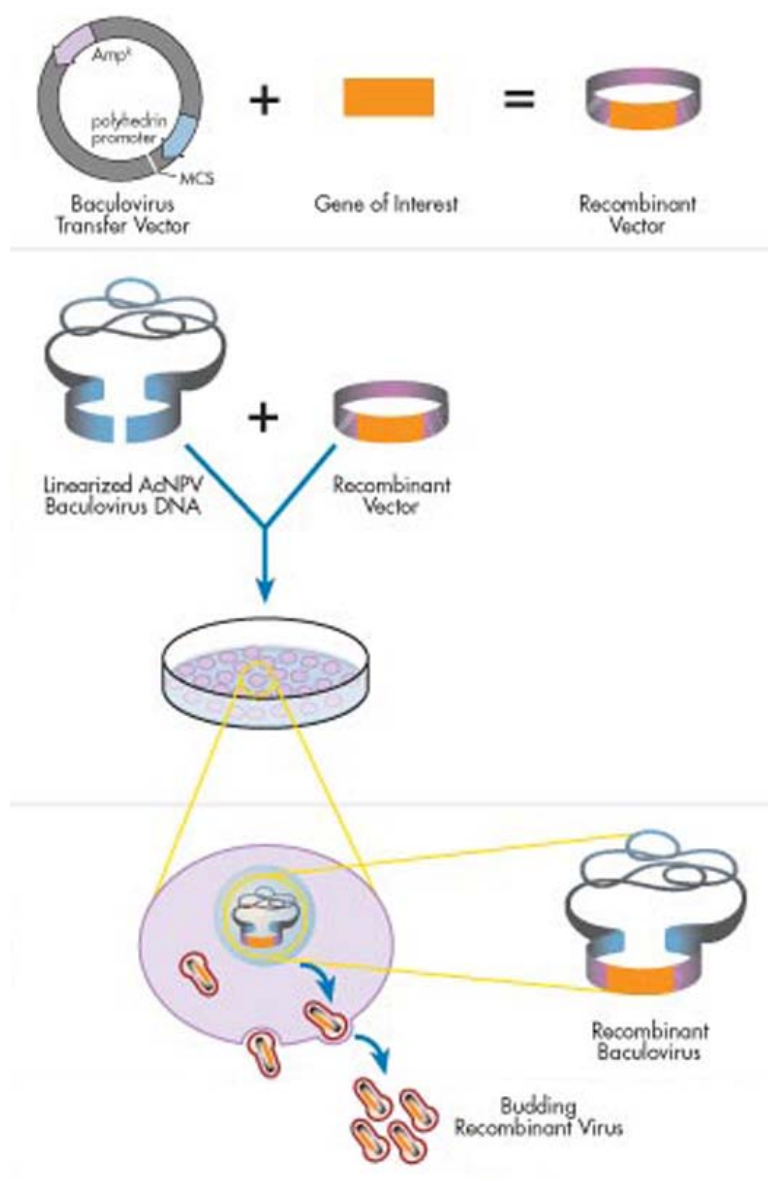
3.2.3.3. Bakulovirová exprese rekombinantních proteinů

Jedním ze způsobů produkce rekombinantních proteinů, které z jakýchkoli důvodů nelze nebo není vhodné exprimovat v bakteriích, je exprese v bakulovirovém expresním vektorovém systému (BEVS) (O'REILLY et al., 1992) za pomoci viru *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV). V tomto systému může být několik bakulovirových genů, neesenciálních pro životní cyklus viru v tkáňové kultuře, nahrazeno jinými geny. Jelikož je bakulovirový genom příliš velký pro snadné vkládání cizích genů, jsou tyto geny klonovány do transferových vektorů. Kotransfekcí transferového vektoru a genomové DNA do hmyzích buněk (*Spodoptera frugiperda* (sf)), buněčná

linie *sf9*) dochází k homologní rekombinaci a vložené geny se integrují do genomové DNA (Obrázek 3.6.). Tento systém má řadu výhod. Proteiny neomezené velikosti jsou produkovány ve vysoké koncentraci, v nativní formě, jsou posttranslačně modifikované a mohou být sekretovány přímo do média, pokud se před vlastní sekvencí kódující námi požadovaný protein nachází sekvence pro jeden z bakulovirových sekrečních signálů (např. gp67). Po úspěšném extracelulárním transportu je gp67 štěpen na membráně. Exprese celého konstruktu je obvykle řízena z velmi silného polyhedrinového nebo p10 promotoru, které patří mezi velmi pozdní promotory polyhedrinových virů. Jedná se o velmi silný promotor.

V rámci této práce byla použita bakulovirová genomová DNA Bac Vector -3000 Triple Cut Virus DNA (Novagen). Jedná se o modifikovanou (AcNPV) bakulovirovou DNA, obsahující letální delecii, která může být revertována homologní rekombinací transferového vektoru. Jako transferový vektor byl použit pAcGP76-B (BD Biosciences Pharmingen). Inzerty byly klonovány do BamHI a EcoRI restrikčních míst tohoto vektoru. Poté byla provedena kotransfekce hmyzích přisedlých buněk (linie *sf9*) oběma typy DNA pomocí FuGene reagentu (Roche). Buňky byly kultivovány čtyři dny, poté byly odebrány supernatanty a byl proveden plakový test k purifikaci viru. Během tohoto testu byly buňky *sf9* infikovány nízkým množstvím viru. K tomu bylo uděláno sériové ředění (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) supernatantů z předchozího kroku a 100 μ l bylo použito k infekci. Poté byly buňky překryty 0,8% nízkotající agarosou, aby bylo zabráněno šíření viru mezi jednotlivými koloniemi. Po sedmi dnech, kdy došlo k vizualizaci plaků, od každého inzertu byly vybrány dva infikované plaky. Infikované plaky mohou být rozpoznány od neinfikovaných díky rozdílné světelné difrakci. Virus způsobuje lýzu buněk a buňky v centru plaku lyzují dříve nežli buňky na jeho okraji. To způsobuje rozdílný ohyb světelných paprsků, procházejících skrz plak. Plaky byly přeneseny do mikrozkušavky s 1 ml média, aby byl eluován bakulovirus. Tím byly opět infikovány a následně po dobu tří dnů kultivovány (nyní již v suspenzní kultuře) suspenzní *sf21* buňky. Následně byly opět odebrány supernatanty, ze kterých byla izolována bakulovirová DNA. Pozitivní klony byly identifikovány pomocí PCR. Buňky *sf21* byly dále infikovány supernatanty pozitivních klonů a následně kultivovány v suspenzní kultuře 72 hodin. Během této doby probíhala exprese a sekrece požadovaných proteinů a po jejím uplynutí byly odebrány supernatanty. Buněčné zbytky byly odstraněny centrifugací za vysokých otáček (10000 g) a supernatanty byly uloženy do 4°C.

Práci spojenou s přípravou a infekcí hmyzích buněk a s produkcí rekombinantních proteinů v nich prováděla Mgr. Marta Dvořáková (ÚMG). Celý postup je detailně uveden v protokolu: BacVector® Transfection Kits (Novagen).



Obrázek 3.6.

Libovolný gen je vložen do transferového vektoru, který je spolu s linearizovanou bakulovirovou DNA kotransfekován do hmyzích buněk (*sf9*). V *sf9* buňkách dochází k homologní rekombinaci za vzniku funkčního viru, který následně pučí z buněk do supernatantu. Zdroj: Upraveno z Baculovirus Expression Vector System Manual 6th Edition May 1999.

3.2.3.4. Izolace buněk kostní dřene

Kostní dřevina byla izolována z kuřat starých 1 až 3 týdny. Kuřata byla usmrcena v atmosféře CO_2 a poté byly sterilně vyjmuty kosti stehenní a bérce. Na proximálních částech vyjmutých kostí byly jehlou vytvořeny otvory a těmito otvory byly vypláchnuty médiem S13 buňky kostní dřene. Buňky byly resuspendovány a přefiltrovány (pro odstranění zbytků vazivové a tukové tkáně) do nové zkumavky. Poté byly buňky podvrstveny 2-6 ml roztoku Ficoll (densita – 1,044 g/ml) a centrifugovány (2500 rpm, 9 min). Během centrifugace byly separovány červené krvinky (pelet) od ostatních buněk (mezivrstva). Buňky mezivrstvy byly přeneseny do nové zkumavky a bylo přidáno 5-10 ml nového S13 média. Následně byly buňky centrifugovány (1500 rpm, 5 min) a médium bylo odsáto. Buňky byly spočteny pomocí přístroje Casy Cell Counter (Innovatis) a byly vysety o koncentraci $2,5 \times 10^6$ buněk/ml na 15 cm misky. Zároveň bylo přidáno SCF (100 ng/ml). Pro selekci T2D buněk bylo v prvních dnech také přidáváno SCF, v následujících dnech (počínaje dnem 2. až 4.) však bylo SCF vyměněno za TGF alfa (5 ng/ml), TGF beta (1 ng/ml) a dexamethason (1 μ M). Buňky

byly pravidelně počítány a udržovány o koncentraci $2,5 \times 10^6$ buněk/ml, dále byly minimálně jednou týdně purifikovány pomocí Ficoll(u).

3.2.3.5. Ověření biologické aktivity rekombinantních proteinů

Pro *in vitro* ověření aktivity produkovaných proteinů byly použity dva druhy testů - diferenční test (měření obsahu hemoglobinu) a test proliferační (měření inkorporace značeného thymidinu).

Pro oba testy byly použity T2D buňky. Buňky byly vysety na několik 96-ti jamkových destiček (30000 buněk na jamku) a byly přidány různé kombinace testovaných vzorků. Celkový objem jedné jamky byl 100 μ l. Takto připravené buňky byly inkubovány 48 hodin (proliferační test) a 72 hodin (diferenční test).

Proliferační test

Po 48 hodinách bylo k buňkám přidáno 25 μ l ^3H -Thymidinu (30 $\mu\text{Ci/ml}$; Lacomed) v DMEM a buňky byly 2 hodiny kultivovány. Poté byly buňky sklizeny přístrojem Harvester 96 (Tomtec), inkorporace značeného thymidinu byla změřena přístrojem na přístroji Wallac MicroBeta[®] TriLux (Perkin Elmer) a vyjádřena v jednotkách cpm („counts per minute“).

Diferenční test

Po 72 hodinách byly buňky resuspendovány a přeneseny do 96-ti jamkových destiček s kónickými dny, ve kterých byly centrifugovány (1000 rpm, 5 min) a bylo odsáto médium. Poté byly buňky promyty 100 μ l 0,07% BSA+PBS a opětovně centrifugovány (1000 rpm, 5 min). Po odsátí BSA+PBS byly buňky resuspendovány ve 25 μ l H_2O , čímž došlo k hypotonické lýze a k uvolnění hemoglobinu. Dále byly vzorky zamrazeny a uchovány přes noc při -80°C . Další den byly vzorky inkubovány 20 min při laboratorní teplotě, poté bylo přidáno 125 μ l hemoglobinového činidla a vzorky byly inkubovány 10-20 min ve tmě. Během této doby nastala barevná reakce hemoglobinu s činidlem. Ve chvíli, kdy byly pozitivní vzorky zabarveny dožluta, byly všechny vzorky přeneseny do nových 96-ti jamkových destiček s rovnými dny, ve kterých bylo předem připraveno 25 μ l STOP roztoku (8N H_2SO_4) a tím došlo k zastavení barevné reakce. Absorbance jednotlivých vzorků při 405 nm byla změřena přístrojem EnVision[®] Multilabel Reader (Perkin Elmer).

4. Výsledky

4.1. Homologie

Kuřecí IL-6 a IL-6R, na rozdíl od jiných cytokinů a růstových faktorů (např. FGFs, TGF alfa, TGF beta, VEGF, atd.), vykazují nízkou homologii se svými savčími ortology (myš, člověk; viz. Appendix 8.2., Tabulka 8.1., Obrázek 8.1.).

Pro účely práce s kuřecími buňkami proto není možné savčí proteiny využít, a tak bylo nezbytné oba proteiny připravit. Paralelně byly fúzovány kódující sekvence IL-6 a sIL-6R za vzniku konstruktů Hyper-IL-6.

4.2. Design primerů

V počátku byly navrženy primery, které bylo možné použít pro klonování pomocí RT-PCR. Pro tento účel byla prohledána databáze GenBank na serveru www.ncbi.nlm.nih.gov, kde byly pro oba proteiny nalezeny jejich kódující sekvence (kuřecí IL-6 Acc. No.: NM_204628; kuřecí IL-6R Acc. No.: AB175664).

Maturované proteiny IL-6 a IL-6R mají na N-konci signální peptid. Jelikož byly primery primárně určeny za účelem exprese proteinů v *E. Coli*, byly primery navrženy tak, aby hybridizovaly ve čtecím rámci až za touto signální sekvencí. 5' primer pro sIL-6R naproti tomu hybridizoval na IL-6R mRNA do oblasti mezi Ig-like doménou a první FNIII doménou. 3' primer hybridizoval do oblasti mezi druhou FNIII doménou a transmembránovou doménou (Obrázek 2.9.; dále viz. Appendix 8.3.).

Primery byly konstruovány pro klonování do BamHI restrikčního místa na 5' konci a do HindIII restrikčního místa na 3' konci, jsou tedy vybaveny krátkou linkerovou sekvencí s tímto restrikčním místem. Dále 3' primery jsou před HindIII sekvencí vybaveny stop kodonem (TGA) a 3' primer pro IL-6 před TGA obsahuje další restrikční místo – AgeI. Obdobně 5' primer pro IL-6 obsahuje za BamHI restrikčním místem místo pro AvrII (sekvence primerů viz. Appendix 8.1.). Pomocí těchto dvou restrikčních míst (AgeI a AvrII) byl fúzován sIL-6R a IL-6 společně s linkerovou sekvencí, která také obsahovala tato dvě restrikční místa. Použité linkerové sekvence tedy byly kromě modifikací na koncích (AgeI a AvrII restrikční místa) shodné se sekvencemi použitými pro přípravu lidského Hyper-IL-6 (FISCHER et al., 1997).

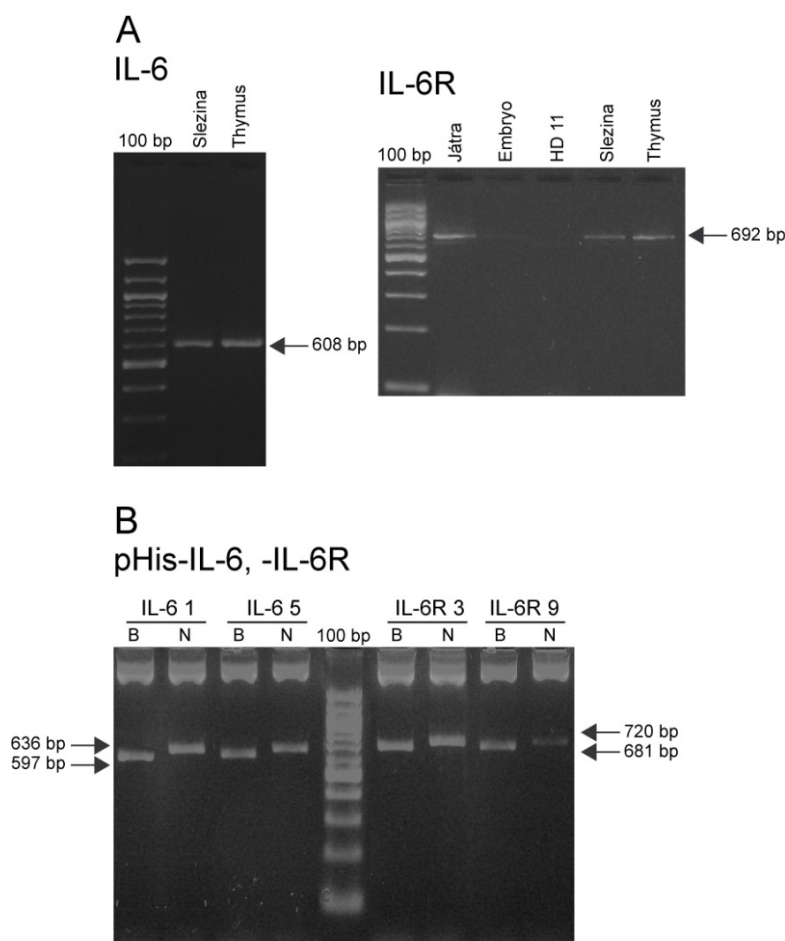
4.3. Reverzní transkripce a klonování IL-6, sIL-6R

Dalším důležitým bodem byl výběr tkáně, ve které dochází k expresi IL-6 a IL-6R. Nakonec byly pro izolaci RNA vybrány tyto kuřecí tkáně: játra, slezina, thymus, dále kuřecí embryo a buňky HD11 (buněčná linie odvozená od transformovaných monocytů). Tkáně byly homogenizovány v TRIzol reagentu a následně byla purifikována celková RNA. Metodou reverzní transkripce bylo poté syntetizováno 1. vlákno cDNA.

Po několika prvních optimalizačních PCR reakcích se podařilo obě kódující sekvence amplifikovat (36 cyklů, anelační teplota 65°C) z cDNA sleziny, thymu a jater (pouze sIL-6R; Obrázek 4.1.a).

PCR produkty s tupými konci (polymerasa Phusion (Finnzymes) zanechává na rozdíl od jiných polymeras tupé konce) poté byly odděleny v nízkotající agarose NuSieve, vyříznuty a purifikovány. Sekvence byly ligovány do SmaI restričního místa vektoru pBSII SK+. Takto vzniklý produkt (pIL-6 a pIL-6R) byl transformován do bakteriálního kmene TOP 10. Na agarosových plotnách s ampicilinem druhý den vyrostlo několik bílých kolonií, ze kterých byla izolována plasmidová DNA a restričním štěpením restriktasami BamHI a HindIII byla ověřena přítomnost inzertu. Dva pozitivní vzorky od každého konstruktu byly sekvenovány a nakonec byl vybrán jeden klon, jež obsahoval kompletní kódující sekvenci bez mutací.

Zbytek izolované plasmidové DNA byl proto opět rozštěpen (endonukleasami BamHI, HindIII) a po elektroforéze v nízkotající agarose NuSieve byl fragment vyříznut a purifikován. Purifikovaný fragment byl ligován s BamHI, HindIII štěpeným a defosforylovaným expresním vektorem pETH2a a ligační produkt (pHis-IL-6 a pHis-IL-6R) byl transformován do bakterií kmene BL21 (DE3)-RIL. Bakterie byly rozetřeny na agarosové plotny s ampicilinem a kultivovány. Z deseti kolonií od každého inzertu byla izolována plasmidová DNA, ověřena přítomnost inzertu (kombinací endonukleas BamHI, HindIII a NdeI, ClaI; Obrázek 4.1.b) a některé pozitivní klony byly před expresí proteinů His-IL-6 a His-IL-6R sekvenovány.

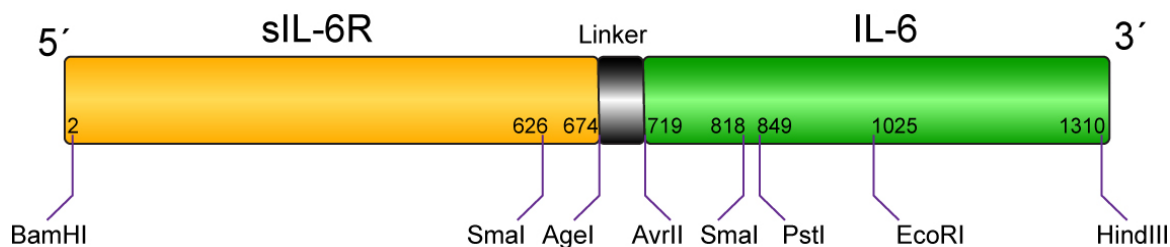


Obrázek 4.1.

Klonování IL-6R a IL-6. (A) RT-PCR, šipka označuje IL-6R/IL-6 fragment určený k vyříznutí. (B) Ověření přítomnosti inzertu. pHis-IL-6, -IL-6R štěpený kombinací restričních endonukleas BamHI, HindIII (označeno B) a NdeI, ClaI (označeno N). Teoretické velikosti očekávaných fragmentů odpovídají velikostem skutečným (označeno šipkami).

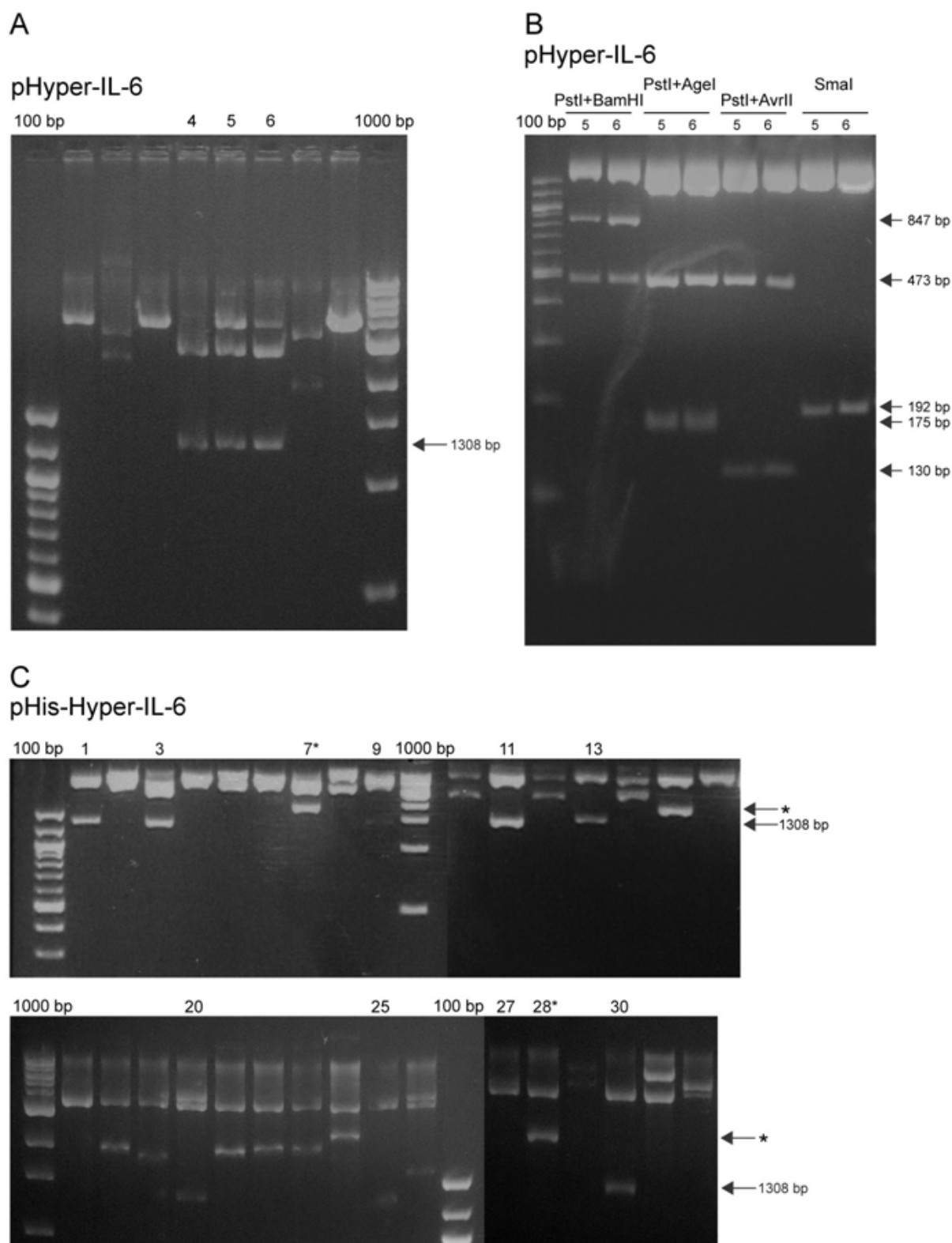
4.4. Klonování Hyper-IL-6

Pro konstrukci Hyper-IL-6 (Obrázek 4.2.) bylo použito pIL-6 a pIL-6R. Plasmid pIL-6R byl štěpen restričními enzymy BamHI, AgeI, čímž došlo ke zrušení stop kodonu (TGA), který byl umístěn za AgeI místem. Plasmid pIL-6 byl štěpen AvrII a HindIII. Inzerty byly poté separovány na agarosovém gelu a byly purifikovány. Mezitím byly anelovány linkerové sekvence (LinkerIL-6-1, LinkerIL-6-2) a byl připraven vektor pBSII SK+, který byl pro účel klonování Hyper-IL-6 štěpen BamHI, HindIII a následně defosforylován. Všechny komponenty pHyper-IL-6 byly poté ligovány v jedné tetramolekulární reakci. Účinek této reakce byl nízký a tak po následné transformaci bakterií kmene TOP 10 muselo být otestováno mnoho kolonií. Nejprve byly izolovaná plasmidová DNA štěpena enzymy BamHI, HindIII (Obrázek 4.3.a). Poté, co byly identifikovány některé pozitivní klony nesoucí inzert o velikosti 1308 bp (Hyper-IL-6), byla tato plasmidová DNA restričně mapována kombinací pěti enzymů (PstI, BamHI, AgeI, AvrII, SmaI; Obrázek 4.3.b) a následně sekvenována. Účelem tohoto mapování bylo ověření správného složení všech částí Hyper-IL-6. Plasmidová DNA testovaných klonů se po těchto pokusech ukázala být v pořádku a tak byl Hyper-IL-6 vyštěpen enzymy BamHI, HindIII a byl ligován do defosforylovaného pETH2a. Vzniklý plasmid pHis-Hyper-IL-6 byl transformován do bakteriálního kmene BL21 (DE3)-RIL, bakterie byly kultivovány a byla z nich izolována plasmidová DNA, která byla poté zkontrolována restričními enzymy BamHI, HindIII (Obrázek 4.3.c). Na závěr před vlastní expresí proteinu His-Hyper-IL-6 byly plasmidové DNA vybraných klonů sekvenovány.



Obrázek 4.2.

Schématicky znázorněná sekvence Hyper-IL-6 a komponenty, ze kterých se skládá. Na 5' konci se nachází sIL-6R, na 3' konci je umístěn IL-6. Obě tyto podjednotky jsou spojeny krátkou linkerovou sekvencí pomocí AgeI a AvrII restričních míst. Na obrázku jsou rovněž zobrazena některá restriční místa, která jsou zmíněna v textu. Čísla udávají páry bazí.



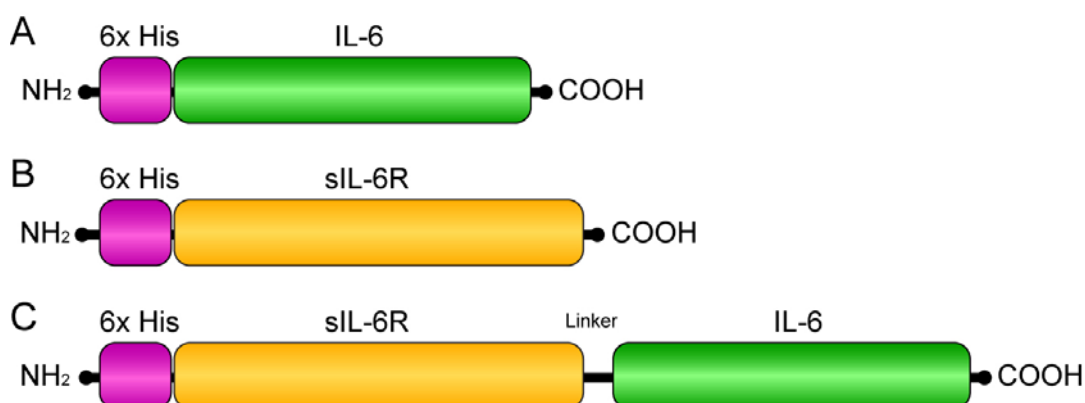
Obrázek 4.3.

Klonování Hyper-IL-6. (A) Detekce klonů, nesoucích fúzaný Hyper-IL-6. Restrikčním štěpením za použití enzymů BamHI a HindIII byla vyštěpena celá Hyper-IL-6 kazeta. Šípkami a číslý 4, 5, 6 jsou označeny pozitivní klony. (B) Restrikční mapování klonu č. 5 a 6. Různými kombinacemi enzymů byly vyštěpeny fragmenty o různých velikostech, které odpovídaly teoretickým fragmentům (viz. Obrázek 4.2.). Fragment o velikosti 473 bp vznikl štěpením PstI místa inzertu a vektoru, které není na Obrázku 4.2. zobrazeno. (C) Ověření

přítomnosti inzertu Hyper-IL-6 ve vektoru pETH2a za použití enzymů BamHI, HindIII. Správná velikost inzertu je 1308 bp. Během ligace docházelo ke vzniku plasmidu, nesoucí inzert o velikosti 1900 bp (označen hvězdičkou). Tento inzert se nepodařilo na základě sekvenace identifikovat.

4.5. Expres proteinů v *Escherichia Coli*

Klony pHis-IL-6, -IL-6R, -Hyper-IL-6 byly sestrojeny za účelem produkce proteinů His-IL-6, His-sIL-6R a His-Hyper-IL-6 (Obrázek 4.4.; dále viz. Appendix 8.4.) v prokaryotickém expresním systému. IL-6 a IL-6R ačkoli jsou *in vivo* glykosylovány, ukázalo se, že pro funkci proteinů tyto glykosylace nejsou nezbytné (SCHNEIDER et al., 2001).



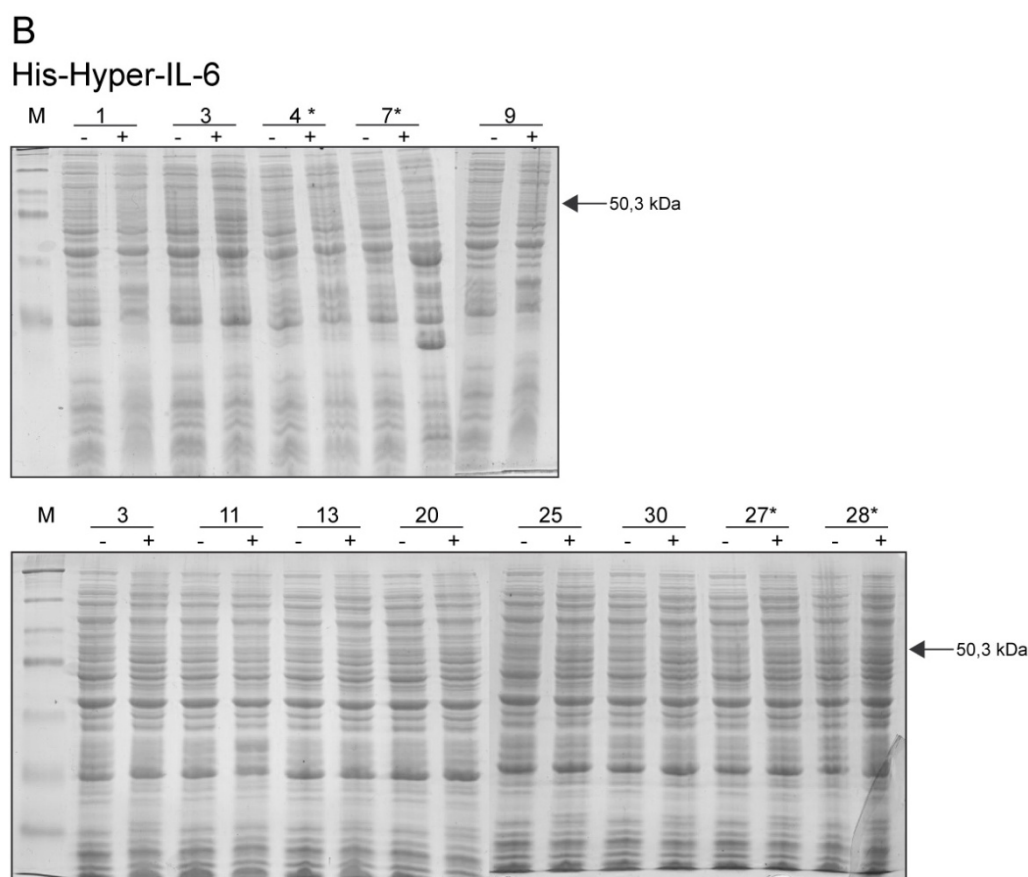
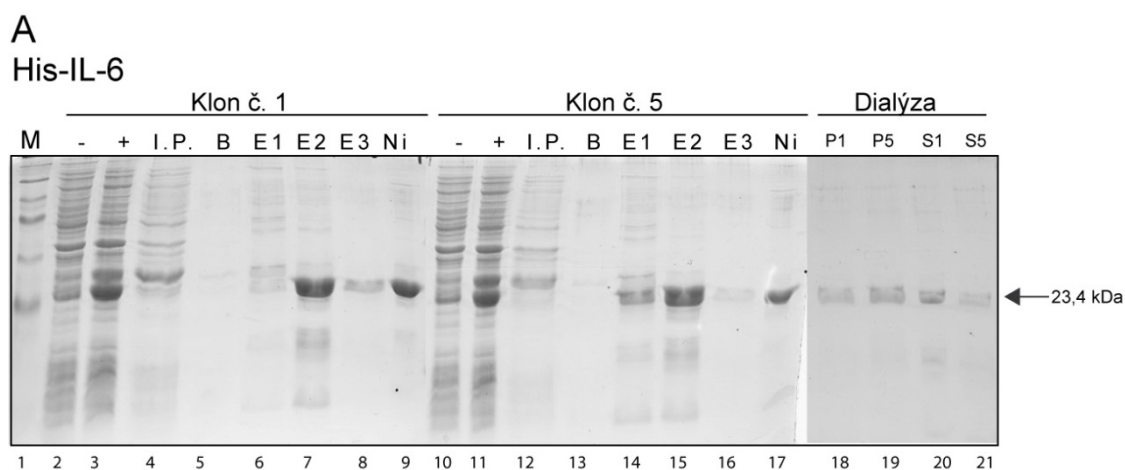
Obrázek 4.4.

Schéma proteinů (A) His-IL-6, (B) His-sIL-6R a (C) His-Hyper-IL-6, určené k prokaryotické expresi. Na N-konci se nachází sekvenční označení šesti histidinů, umožňující purifikaci pomocí Ni^{2+} -NTA agarosy.

Klony pHis-IL-6, -IL-6R, -Hyper-IL-6 byly kultivovány do OD 0,6. Poté byl odebrán alikvot (-) a ke zbytku (+) bylo přidáno IPTG pro indukci rekombinantních proteinů. Po dvouhodinové kultivaci byly připraveny lyzáty, které byly analyzovány na SDS polyakrylamidovém gelu. (Obr. 4.5.a,b)

Podařilo se indukovat pouze expresi proteinu His-IL-6 a His-IL-6 byl následně purifikován a dialyzován. Všechny His-IL-6 vzorky byly analyzovány na SDS polyakrylamidovém gelu. Dále byla změřena koncentrace His-IL-6 po dialýze, která činila 68 ng/ μl . Takto nízká koncentrace byla způsobena skutečností, že velká část His-IL-6 během dialýzy vyprecipitovala (Obrázek 4.5.a, linka 20, 21).

Proteiny His-Hyper-IL-6 (Obrázek 4.5.b) a His-sIL-6R (nezobrazeno) se i přes optimalizace (indukce za nižší teploty a po delší dobu) nepodařilo indukovat. Přestože vybrané klony byly sekvenovány a žádné mutace nebyly nalezeny, byla pro potvrzení nepoškozeného čtecího rámce (ORF) zvolena technika *in vitro* transkripce/translace.

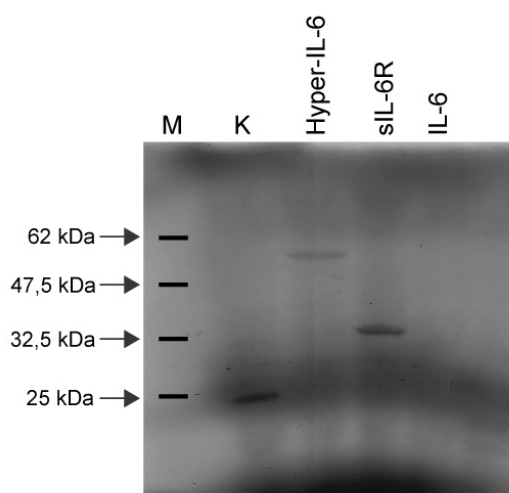


Obrázek 4.5.

Expresce proteinů His-IL-6 a His-Hyper-IL-6. V bakteriálním expresním systému se u dvou klonů (č.1 a č.5) podařilo indukovat expresi proteinu His-IL-6 (A) a následně purifikovat pomocí Ni²⁺-NTA agarosy. Poté byl His-IL-6 dialyzován (vzorky S1 a S5). Velká část proteinu během dialýzy vyprecipitovala. Tento precipitát (vzorky P1 a P5) se podařilo opětovně rozpustit v pufru B (viz. 4.1.12.4.). Šipkou je označen His-IL-6. „Minus“ označuje neindukované vzorky, „plus“ vzorky indukované. I.P. - „input“ (bakteriální supernatant inkubovaný s Ni²⁺-NTA agarosou); B – promytí pufr B; E1, 2, 3 – jednotlivé eluce; Ni - Ni²⁺-NTA agarosa po eluci. (B) Expresce His-Hyper-IL-6. Protein nebyl indukován. Šipkou označen předpokládaný produkt, hvězdičkou označeny kontrolní klony (vzorek č. 4 a 27 neobsahuje žádný inzert, vzorek č. 7 a 28 obsahuje inzert o velikosti 1900 bp)

4.6. *In vitro* transkripce/translace

Z důvodu *in vitro* transkripce/translace (TnT) bylo nutno inzerty klonovat do vektoru pCS2+. Inzerty byly vyštěpeny z vektoru pETH2a pomocí restrikčních enzymů NdeI a ClaI. Obě tato restrikční místa se nacházela v sekvenci pETH2a a štěpením těchto míst tedy došlo k vyštěpení celého inzertu společně s částí vektoru, včetně ATG kodonu na 5' konci. Tato kazeta byla v několika krocích vložena do ClaI (sIL-6R, Hyper-IL-6) nebo do BamHI, ClaI (IL-6) štěpeného a defosforylovaného pCS2+. V prvním kroku ligace došlo ke spojení kohezních ClaI/ClaI konců, v druhém kroku byly zbylé konce zatupeny T4 DNA polymerasou a v závěrečném kroku byly oba tupé konce ligovány. Poté byly takto vzniklými plasmidy (pCS-IL-6, -IL-6R, -Hyper-IL-6) transformovány bakterie kmene TOP 10 a pomocí PCR byly identifikovány pozitivní klony, nesoucí požadovaný inzert o správné orientaci. Z těchto klonů byla izolována plasmidová DNA, která byla sekvenována a poté použita jako templát pro TnT reakci. Po ukončení reakce byly produkty elektroforeticky separovány a autoradiograficky detekovány (Obrázek 4.6.). Kromě IL-6 byly detekovány všechny proteiny (Obrázek 4.6.). Důvod, proč IL-6, přestože tvoří součást Hyper-IL-6 a jako jediný byl indukován v bakteriích, nebyl detekován, není zřejmý. Expresce nejspíš probíhala s nízkou účinností a protein tak nemohl být za stávajících podmínek detekován.



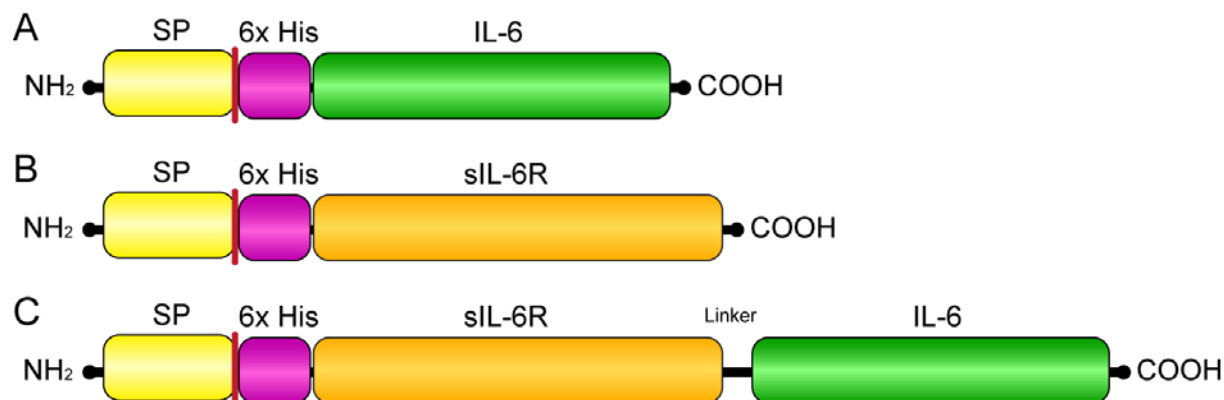
Obrázek 4.6.

Autoradiogram *in vitro* transkripce/translace proteinů Hyper-IL-6 (50,3 kDa), sIL-6R (27 kDa), IL-6 (23,4 kDa) a K (22 kDa).

4.7. Expres IL-6, sIL-6R, Hyper-IL-6 v savčí buněčné linii HEK 293

K expresi proteinů v buňkách HEK 293 byly použity inzerty ligované ve vektoru pCS2+. Jelikož však tyto konstrukty (pCS-IL-6, -IL-6R, -Hyper-IL-6) neobsahovaly sekreční signál (SP), potřebný pro transport proteinů do média, bylo nutno tento signál do konstruktů vložit. Za tímto účelem byly navrženy čtyři oligonukleotidy (His-hIL-6-Leader-1, His-hIL-6-Leader-2, His-hIL-6-Leader-3 a His-hIL-6-Leader-4; sekvence viz. Appendix 8.1.), které po anelaci vytvořily modifikovanou signální sekvenci lidského IL-6 (viz. Appendix 8.5., Obrázek 8.2.). Tato modifikace spočívala v umístění sekvence 6-ti histidinů za místo štěpení signálního peptidu a na oba konce signální sekvence byly navrženy BamHI restrikční místa. Před vlastním klonováním byla primární aminokyselinová sekvence SP *in silico* analyzována, zda-li splňuje veškeré podmínky potenciálně funkčního SP (viz. Appendix 8.5., Obrázek

8.2.). Tento SP byl označen „HisL“ a byl vložen do konstruktů pCS-IL-6, -IL-6R, -Hyper-IL-6, štěpených enzymem BamHI za vzniku plasmidů pCS-HisL-IL-6, -IL-6R, -Hyper-IL-6 a proteinů HisL-IL-6, -sIL-6R, -Hyper-IL-6 (Obrázek 4.7.; dále viz. Appendix 8.4.).



Obrázek 4.7.

Schéma proteinů (A) HisL-IL-6, (B) HisL-sIL-6R a (C) HisL-Hyper-IL-6, určené k expresi v savčím expresním systému. Na N-konci se nachází signální peptid (SP), který je během extracelulárního transportu štěpen na membráně (místo štěpení označeno červenou čarou). C-terminálně od místa štěpení se nachází sekvence šesti histidinů.

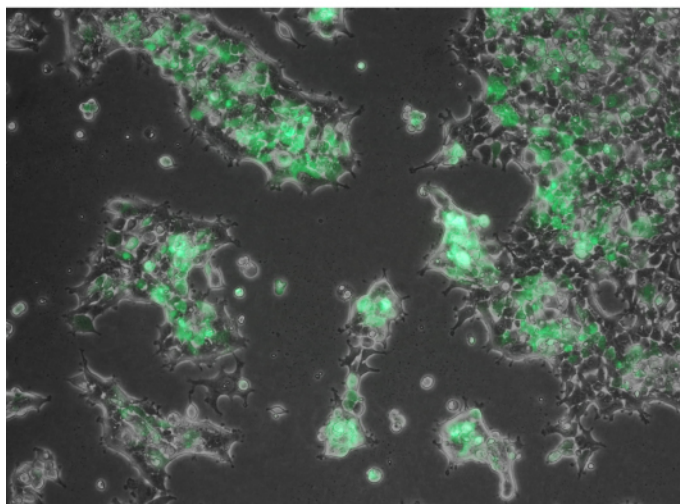
Plasmidy byly transformovány do bakteriálního kmene TOP 10 a plasmidová DNA byla následně izolována, změřena její koncentrace, sekvenována a použita na transienční transfekci buněk HEK 293. Jako kontrola transfekce byl kotransfekován plasmid pEGFP-C3 (Clontech), nesoucí GFP kódující sekvenci, spolu s plasmidem pCS-HisL-Hyper-IL-6. Účinnost transfekce v průměru činila přibližně 57% (Obrázek 4.8.).

Po 72 hodinách od transfekce byly z buněk HEK 293 odebrány supernatanty, které byly použity pro *in vitro* experimenty. Část těchto supernatantů byla rovněž použita pro purifikaci His-tagovaných proteinů, které byly následně separovány na polyakrylamidovém gelu a detekovány metodou „Western Blotting“ (Obrázek 4.9.).

Na exponovaném rentgenovém filmu byl jasně detekován protein HisL-Hyper-IL-6 a HisL-IL-6, naproti tomu HisL-sIL-6R se detekovat nepodařilo.

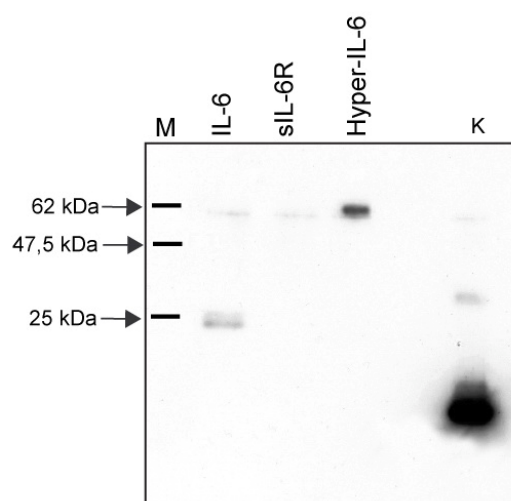
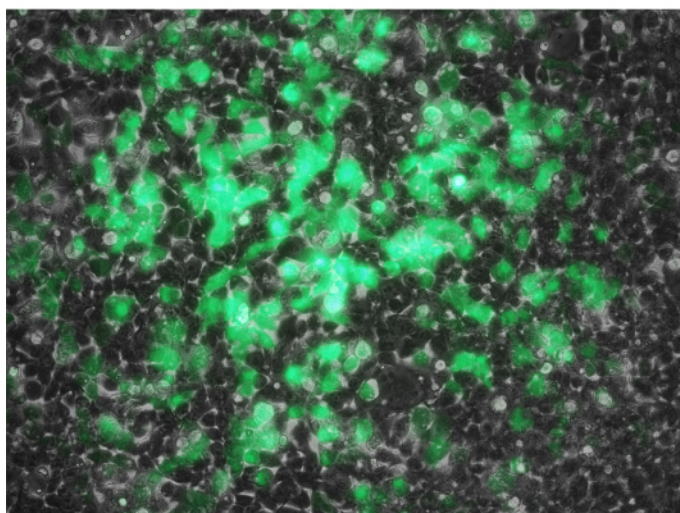
pEGFP-C3
+ pCS-HisL-Hyper-IL-6

HEK 293



Obrázek 4.8.

Účinnost transfekce buněk HEK 293. Kontrolní buňky byly simultánně transfekovány pEGFP-C3 (nesoucí GFP kódující sekvenci) a pCS-HisL-Hyper-IL-6. V zelených buňkách dochází k produkci GFP. Buňky byly pozorovány ve fázovém kontrastu a při fluorescenci. Výsledné obrázky poté byly překryty.

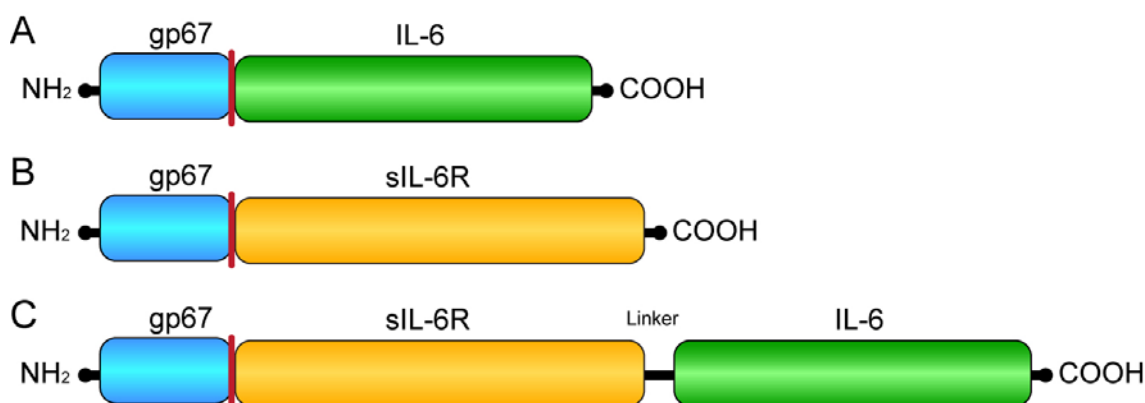


Obrázek 4.9.

Detekce metodou „Western blotting“ purifikovaných HEK 293 supernatantů. Proteiny byly detekovány anti-His protilátkou. V oblasti okolo 25 kDa se nachází IL-6 a v oblasti okolo 62 kDa je purifikovaný Hyper-IL-6. Purifikovaný sIL-6R se detekovat nepodařilo.

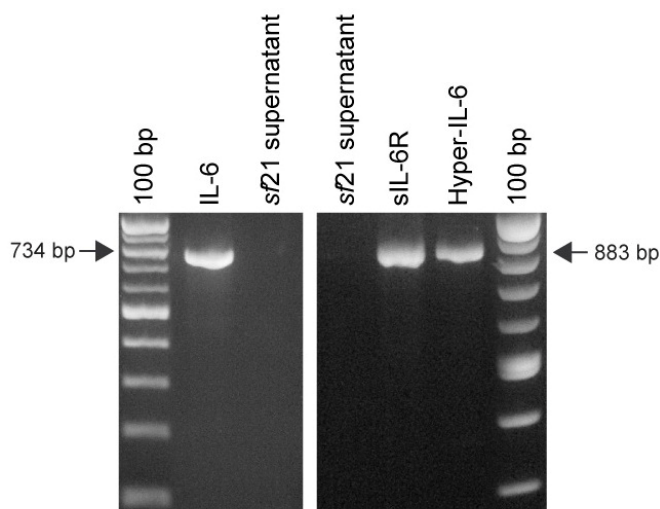
4.8. Expres proteinů v hmyzí buněčné linii *sf9*, *sf21*

Pro expresi proteinů v hmyzích buňkách (proteiny označeny Gp67-IL-6, -sIL-6R, -Hyper-IL-6; Obrázek 4.10.) bylo použito bakulovirového expresního systému (O'REILLY et al., 1992). Za tímto účelem byly inzerty IL-6, sIL-6R a Hyper-IL-6 vyštěpeny z vektoru pETH2a enzymy BamHI a EcoRI a následně ligovány do bakulovirového transferového vektoru pAcGp67-B,štěpeného BamHI, EcoRI. Takto vzniklými plasmidy (pGp67-IL-6, -sIL-6R, -Hyper-IL-6) byly transformovány bakterie kmene TOP 10, plasmidová DNA byla izolována a použita spolu s bakulovirovou genomovou DNA na kotransfekci hmyzích přisedlých buněk *sf9*. Po počáteční amplifikaci a selekci rekombinantního viru byl proveden plakový test. Přítomnost rekombinantního virového potomstva u jednotlivých klonů byla ověřena pomocí PCR (Obrázek 4.11.) za použití specifických primerů – pro klony nesoucí sIL-6R a Hyper-IL-6 kódující sekvence byla použita kombinace primerů pVL-1 (Obrázek 3.4.; sekvence pVL-1 viz. Appendix 8.1.) a IL-6R-2, pro klony nesoucí IL-6 kódující sekvenční byla použita kombinace primerů pVL-1 a IL-6-2). Poté byly supernatanty pozitivních klonů infikovány suspenzní buňky *sf21* a ty byly kultivovány dalších 72 hodin. Během této doby došlo k expresi rekombinantních proteinů a jejich sekreci do média. Následně bylo médium centrifugováno a supernatanty byly uchovány pro další použití.



Obrázek 4.10.

Schéma proteinů (A) Gp67-IL-6, (B) Gp67-sIL-6R a (C) Gp67-Hyper-IL-6, určené k expresi pomocí bakulovirového expresního systému. Na N-konci se nachází bakulovirový sekreční peptid (gp67), který je během extracelulárního transportu štěpen na membráně (místo štěpení označeno červenou čarou).



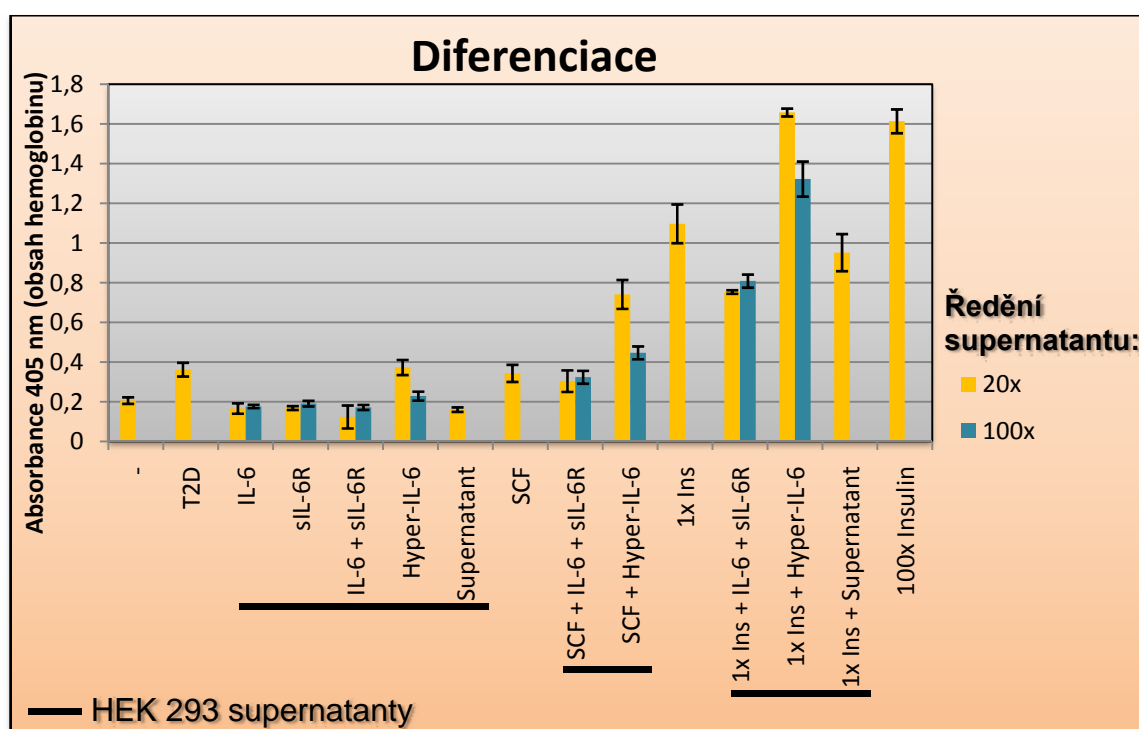
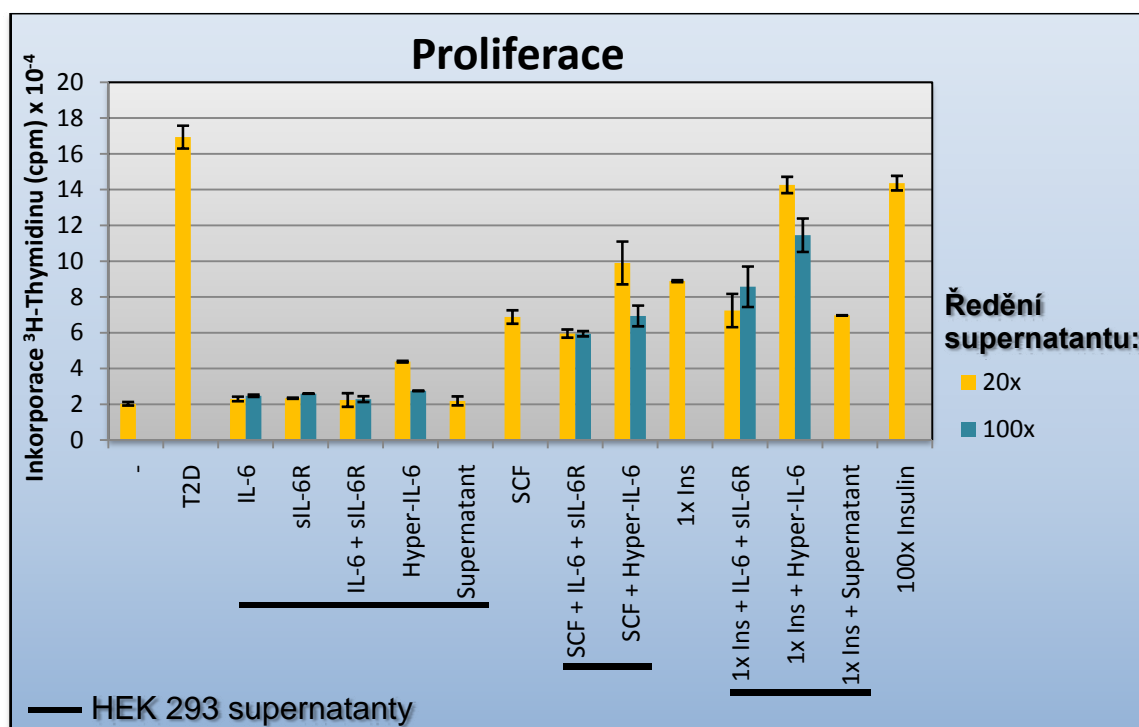
Obrázek 4.11.

Plakový test a následná identifikace pozitivních klonů pomocí PCR. Šípkami jsou označeny specifické PCR produkty. Jako kontrola byl použit neinfikovaný *sf21* supernatant.

4.9. Biologická aktivita proteinů IL-6, sIL-6R, Hyper-IL-6

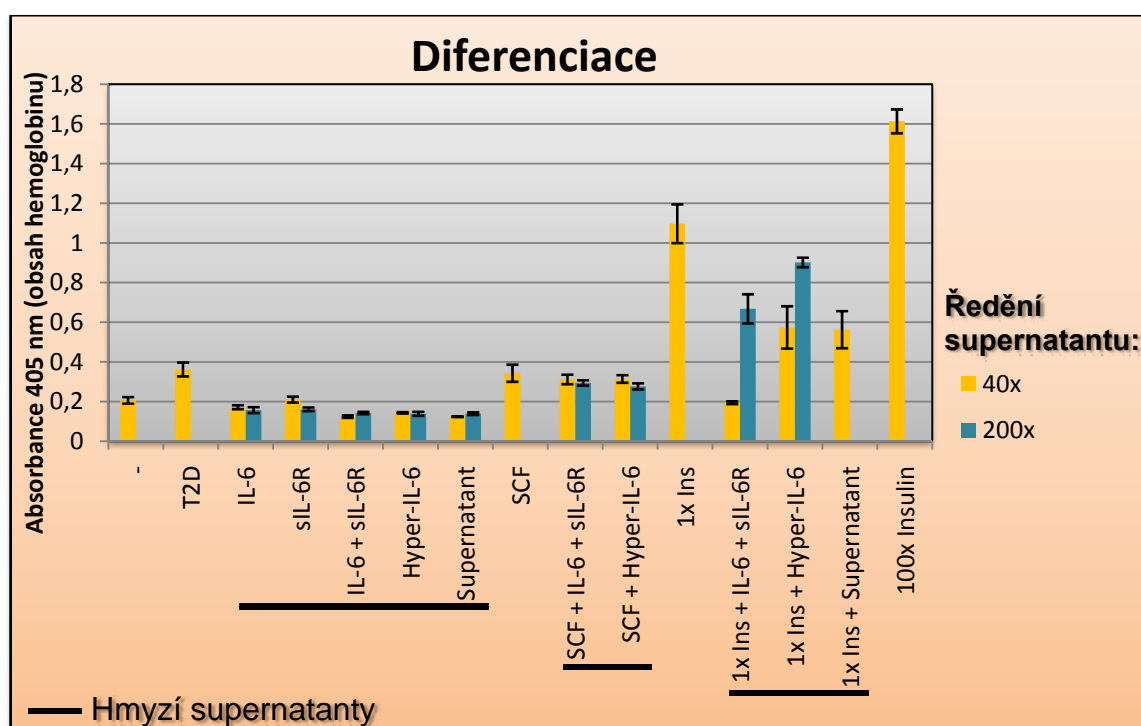
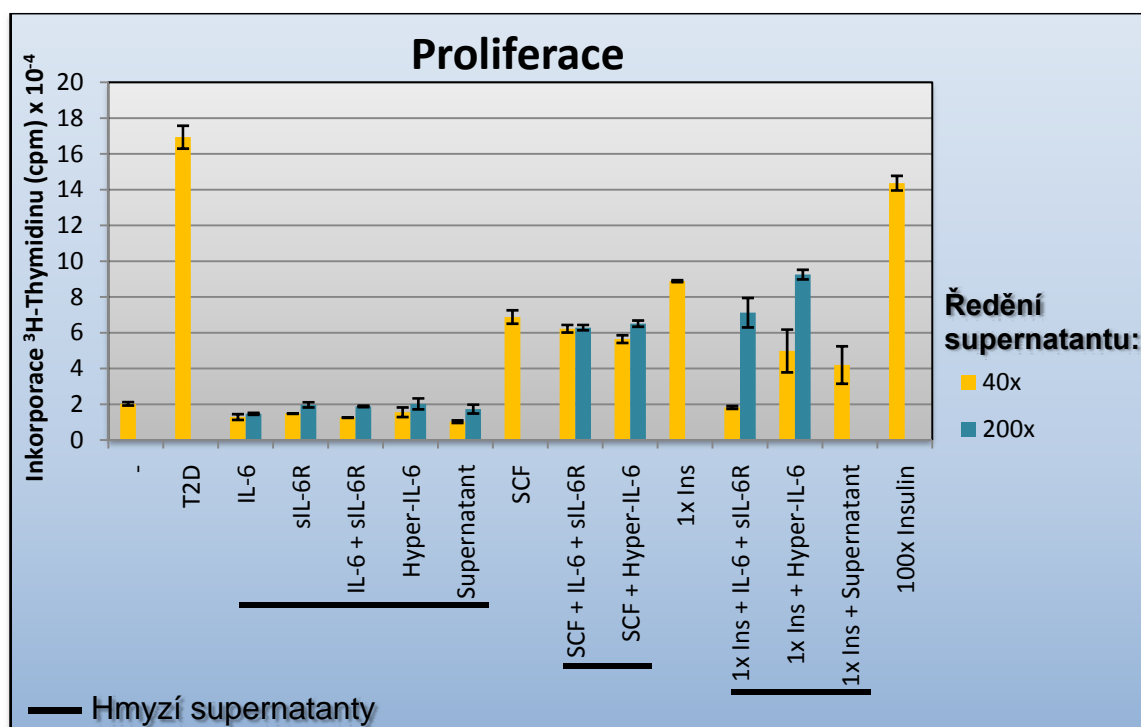
Biologická aktivita exprimovaných proteinů byla ověřena *in vitro* na kuřecích hematopoetických progenitorových buňkách. Tyto buňky mohou být rozděleny do dvou populací – do populace exprimující a neexprimující IL-6R (IL-6R^{pos./neg.}) (TAJIMA et al., 1996) (viz. kapitola 2.4.4.). Z hematopoetických progenitorů IL-6R^{neg.} dochází k diferenciaci erytroidních progenitorů, megakaryocytů a granulocytů-monocytů. Tyto buňky jsou díky nepřítomnosti IL-6R ideálním modelem pro studium mechanismů transsignalizace a působení proteinů jako je Hyper-IL-6. Proto byla primárně pro *in vitro* ověření biologické aktivity připravovaných proteinů (hlavně Hyper-IL-6) vybrána subpopulace erytroidních progenitorů T2D, které jsou dependentní na TGF alfa, TGF beta a dexamethasonu (viz. kapitola 2.5.1.). V přítomnosti těchto faktorů T2D buňky proliferují a pokračují v sebeobnově („self-renewal“). V přítomnosti insulinu však dochází k terminální diferenciaci. Naší pracovní hypotézou bylo, že Hyper-IL-6 synergicky působí s dalšími faktory. Tuto hypotézu se podařilo potvrdit (Obrázek 4.12.). Během těchto experimentů byla publikována práce prokazující vliv lidského Hyper-IL-6 na diferenciaci lidských erytroidních prekurzorů. Dalšími typy buněk použitými pro *in vitro* experimenty byly TEP buňky (BARTUNEK et al., 2008). Z časových důvodů však tyto experimenty nebyly dokončeny a data proto nejsou v rámci této diplomové práce zahrnuta.

Na T2D buňkách byly provedeny dva druhy testů – proliferační test a diferenciací test. Proliferační test byl založen na měření inkorporace ³H-thymidinu do DNA dělících se buněk. Pomocí diferenciacího testu byla naopak měřena akumulace hemoglobinu v diferencujících buňkách. Testy probíhaly na 96-ti jamkových destičkách. K buňkám byly přidány kombinace následujících faktorů a hormonů – SCF (100 ng/ml); TGF alfa (5 ng/ml)+TGF beta (1 ng/ml)+dexamethason (1 μM) – souhrnně označeno T2D; insulin (1 μg/ml nebo 10 ng/ml); HEK 293 supernatanty (ředěny 20x a 100x); supernatanty hmyzích buněk (ředěny 40x a 200 x). Výsledky testů byly vyneseny do grafů (Obrázek 4.12., 4.13.). Insulin a T2D sloužily jako pozitivní kontroly pro diferenciací test (insulin) a proliferační test (T2D).



Obrázek 4.12.

Vliv proteinů HisL-IL-6, -sIL-6R, -Hyper-IL-6 obsažených v HEK 293 supernatantech na proliferaci a diferenciaci erytroidních progenitorů. Proteiny HisL-IL-6 a HisL-sIL-6R dle očekávání neměly při dané koncentraci na T2D buňky žádný efekt. Naproti tomu HisL-Hyper-IL-6 stimuloval proliferaci a diferenciaci T2D. Tento efekt byl umocněn v kombinaci HisL-Hyper-IL-6 s SCF, případně s insulinem. Supernatanty byly ředěny 20x a 100x. Jako pozitivní kontrola bylo u proliferačního testu použito T2D, u diferenciálního testu byl použit insulin. 100x insulin odpovídá koncentraci 1 µg/ml a 1x insulin odpovídá koncentraci 10 ng/ml.

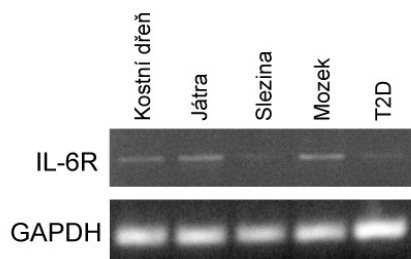


Obrázek 4.13.

Vliv proteinů Gp67-L-IL-6, -sIL-6R, -Hyper-IL-6 obsažených v supernatantech hmyzích buněk na proliferaci a diferenciaci erytroidních progenitorů. Proteiny Gp67-IL-6 a HisL-sIL-6R neměly na T2D buňky žádný efekt a efekt Gp67-Hyper-IL-6 nebyl jakkoli výrazný. Při vyšší koncentraci měly supernatanty cytotoxický efekt. Supernatanty byly ředěny 40x a 200x. Jako pozitivní kontrola bylo u proliferačního testu použito T2D, u diferenciačního testu byl použit insulin. 100x insulin odpovídá koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 1x insulin odpovídá koncentraci 10 ng/ml .

4.10. Tkáňová exprese IL-6R

Za účelem zjištění exprese IL-6R ve vybraných kuřecích tkáních bylo provedeno RT-PCR. Byly vybrány tyto tkáně – kostní dřeň, játra, slezina, mozek, T2D buňky. RNA těchto tkání byla izolována a 3 µg byly použity jako templát pro syntézu 1. vlákna cDNA. Poté bylo provedeno PCR. Pro amplifikaci IL-6R byly použity primery IL-6R-1, IL-6R-2. Dle očekávání byla IL-6R mRNA detekována v játrech a v kostní dřeni. Zároveň však došlo k detekci této mRNA také v mozku a částečně ve slezině a T2D buňkách (Obrázek 4.14.).



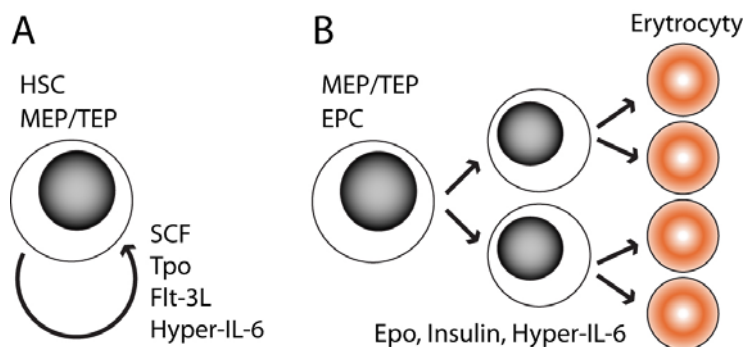
Obrázek 4.14.

Lokalizace exprese IL-6R v některých kuřecích tkáních. Jako kontrola byly použity primery pro GAPDH.

5. Diskuze

Již dříve bylo poukázáno, že tvorba IL-6/sIL-6R komplexu může být usnadněna fúzí obou proteinů v rámci jedné molekuly. Takto vzniklý protein byl pojmenován „Hyper-IL-6“ (FISCHER et al., 1997). Na N-konci tohoto proteinu se nacházel lidský sIL-6R, na C-konci lidský IL-6 a obě podjednotky byly spojeny linkerovou sekvencí. Od doby, kdy byl Hyper-IL-6 poprvé sestrojen (FISCHER et al., 1997), byl mnohokrát použit jako cenný nástroj pro práci s lidskými a myšími hepatocyty a hematopoetickými buňkami (FISCHER et al., 1997; PETERS et al., 2000; AUDET et al., 2001; HECHT et al., 2001). Hyper-IL-6 byl spolu s SCF a dalšími cytokiny použit pro účinnou *ex vivo* expanzi hematopoetických progenitorů (FISCHER et al., 1997). Nedávno bylo ukázáno, že stimulace receptoru gp130 u erytroidních progenitorů vede k jejich diferenciaci a maturaci na erytrocyty (YU et al., 2006). Efektivní koncentrace lidského Hyper-IL-6 byla oproti efektivní koncentraci komplexu IL-6/sIL-6R mnohonásobně nižší (100 až 1000x) a také stabilita Hyper-IL-6 byla oproti IL-6 významně vyšší (PETERS et al., 1998).

Na základě těchto poznatků byl v rámci této diplomové práce sestrojen první nesavčí Hyper-IL-6, a to kuřecí. Jedním z důvodů přípravy kuřecího Hyper-IL-6 bylo ověření stupně konzervace jednotlivých molekulárních mechanismů a signálních drah, kterým dochází k proliferaci či diferenciaci hematopoetických kmenových buněk a jejich prekursorů. Víme, že obecně je kontrola těchto procesů poměrně úzce evolučně fixována. Otázkou však zůstává, do jaké míry se v ní uplatňuje aktivace gp130, ať už pomocí sIL-6R nebo pomocí Hyper-IL-6. Tato práce alespoň zčásti naznačuje, že aktivace gp130 pomocí Hyper-IL-6 má jak u savců, tak u ptáků podobný efekt – synergické působení spolu s dalšími faktory (Obrázek 5.1.).



Obrázek 5.1.

Vliv SCF, Tpo, Flt-3L, Epo, Insulinu a Hyper-IL-6 na HSC, MEP/TEP a EPC buňky. (A) Kombinace SCF, Tpo nebo Flt-3L společně s Hyper-IL-6 stimuluje sebeobnovu buněk, jejich proliferaci a blokuje diferenciaci. (B) Pokud je však Hyper-IL-6 kombinován s Epo nebo Insulinem, dochází k buněčné diferenciaci a proliferaci. Hyper-IL-6 tedy působí s dalšími faktory synergicky a má vliv na buněčnou sebeobnovu a proliferaci.

Hyper-IL-6 byl připraven obdobně jako lidský Hyper-IL-6 (FISCHER et al., 1997). Na N-konci proteinu byl umístěn kuřecí sIL-6R, na C-konci byl umístěn maturovaný IL-6 a obě části byly propojeny linkerovou sekvencí, která byla totožná s linkerovou sekvencí lidského Hyper-IL-6 (FISCHER et al., 1997). Jako část kódující sIL-6R byla použita oblast IL-6R, která obsahovala první a

druhou FNIII doménu. Z sIL-6R tak byla vyřazena N-terminální Ig-like doména a C-terminální transmembránová doména. Hyper-IL-6 byl exprimován v bakteriích, v savčím a bakulovirovém expresním systému. Zároveň byly exprimovány kuřecí ortology IL-6 a sIL-6R. Produkce těchto molekul v jednotlivých expresních systémech měla různou účinnost.

Expres v *E. Coli* byla vybrána coby jeden z nejsnazších způsobů produkce velkého množství rekombinantního proteinu. Jelikož posttranslační modifikace a glykosylace nejsou pro funkci kuřecího IL-6 nezbytné (SCHNEIDER et al., 2001). Jako jediný protein se v *E. Coli* podařilo exprimovat IL-6 (Obrázek 4.5.). K výrazné indukci sIL-6R a Hyper-IL-6 i přes mnohé technické optimalizace nedocházelo (Obrázek 4.5.). Jednotlivými důvody mohly být:

- Rozdíly mezi používanými prokaryotickými/eukaryotickými kodony v kódující sekvenci.
- Poškozený T7 promotor, ze kterého je řízena transkripce vloženého genu v plasmidu.
- Poškozený otevřený čtecí rámec (ORF) kódující sekvence.
- Toxicita proteinů pro bakteriální buňky, atd.

Pro optimalizaci exprese eukaryotických proteinů v *E. Coli* byl použit speciální kmen *Escherichia coli* BL21 (DE3)-RIL, nesoucí geny pro některé eukaryotické tRNA (arginin, isoleucin a leucin). Z důvodu možných mutací a poškozeného čtecího rámce byla oblast T7 promotoru i celé sIL-6R a Hyper-IL-6 kódující sekvence několikrát sekvenována. Žádné mutace nebyly nalezeny. Domníváme se tedy, že k expresi proteinů sIL-6R a Hyper-IL-6 v buňkách *E. Coli* nedocházelo z důvodu toxicity sIL-6R a že ani stabilizace Hyper-IL-6 pomocí IL-6 neumožnila úspěšnou indukci Hyper-IL-6. Komplikace s bakteriální expresí lidského Hyper-IL-6 zřejmě provázely též autory popisující první Hyper-IL-6, jelikož pro jeho expresi nakonec použili kvasinkového expresního systému (FISCHER et al., 1997).

Aby byla zcela vyloučena možnost poškozeného ORF, byla provedena *in vitro* transkripce/translace (TnT) jednotlivých kódujících sekvencí. Tento experiment jednoznačně prokázal funkční ORF celého Hyper-IL-6 (tudíž i jeho komponent - IL-6 a sIL-6R; Obrázek 4.6.). Rovněž byl pomocí TnT detekován samotný sIL-6R. IL-6 však detekován nebyl (Obrázek 4.6.). Tento fakt vysvětlujeme mírnými odchylkami v klonovací strategii, kterou byl konstruován sIL-6R a Hyper-IL-6 oproti IL-6, díky čemuž byla sekvence v okolí ATG kodonu (Kozak) (PERI and PANDEY, 2001) odlišná.

Dále jsme se rozhodli exprimovat IL-6, sIL-6R a Hyper-IL-6 v buňkách HEK 293 a v hmyzích buňkách pomocí bakuloviru. Ačkoli účinnost transienční transfekce jednotlivými plasmidy buněk HEK 293 byla podobná (pro ilustraci viz. Obrázek 4.8.), také v tomto expresním systému byly proteiny exprimovány s rozdílnou účinností. Protože konstrukty nesly na N-konci sekvenci 6-ti histidinů, proteiny mohly být po sekreci do média purifikovány a účinnost exprese mohla být analyzována metodou „Western blotting“ (Obrázek 4.9.). Podařilo se úspěšně detekovat proteiny HisL-IL-6 a HisL-Hyper-IL-6, naopak protein HisL-sIL-6R se detekovat nezdařilo. To však nepopírá skutečnost, že k indukci HisL-sIL-6R i přesto mohlo s nižší efektivitou docházet. Pro optimální detekci protilátkou byla indukovaná koncentrace sIL-6R nízká. Nízká efektivita produkce HisL-sIL-6R jako taková mohla být zapříčiněna několika důvody. Kuřecí sIL-6R může být pro lidské buňky HEK

293 toxický. Také mohlo dojít během klonování k mutaci v kódující sekvenci sIL-6R či signálního peptidu a následné chybě ve čtecím rámci. Přestože se tato možnost nezdá být příliš pravděpodobná, jelikož DNA konstrukt byl opakovaně sekvenován, může být teoreticky připuštěna.

Metodou „Western blotting“ bývá obvykle stanovena také účinnost proteinové exprese v bakulovirovém expresním systému. Protože však naše bakulovirové konstrukty nebyly histagované, nemohla být účinnost exprese tímto způsobem analyzována. Přesto podle výsledků plakového testu (Obrázek 4.11.) usuzujeme, že během přípravy exprese došlo k rekombinaci viru a proteiny by se měly bez potíží exprimovat.

Po přípravné fázi proteinů jsme se zaprvé rozhodli otestovat efekt Hyper-IL-6 na eytroidní progenitorové buňky. Shodou okolností byla během našich experimentů publikována práce ukazující vliv lidského Hyper-IL-6 na diferenciaci lidských erytroidních prekurzorů, což potvrzuje i naše výsledky.

Kuřecí Hyper-IL-6 obsažený v HEK 293 supernatantech v kooperaci s nízkou koncentrací insulinu (10 ng/ml) stimuloval diferenciaci T2D dependentních erytroidních progenitorových buněk (Obrázek 4.12.) a tato kombinace dokonce mírně předčila vliv insulinu o standardní koncentraci (1 µg/ml) na tyto buňky. Také kombinace Hyper-IL-6 a SCF (100 ng/ml) měla diferenciačně stimulační efekt, ale ten nebyl tak výrazný, a dokonce i samotný Hyper-IL-6 v omezené míře stimuloval diferenciaci T2D. Dle očekávání samotný IL-6 ani kombinace IL-6/sIL-6R neměla při daných koncentracích žádný efekt. Pro vysvětlení nefunkčnosti IL-6 na T2D buňky bylo provedeno RT-PCR (Obrázek 4.14.), ve kterém byla analyzována exprese IL-6R v některých tkáních a buňkách. Dle výsledku tohoto RT-PCR dochází na buňkách T2D jen k minimální expresi IL-6R. IL-6 se tedy na tyto buňky není schopen efektivně vázat, tudíž nedochází k dostatečné aktivaci gp130, která by se projevila na fenotypu buněk (např. jejich diferenciací). Nízká efektivita vazby IL-6 na buňky exprimující malé množství IL-6R je dána kinetikou sestavení IL-6 receptorového komplexu. Jak již bylo popsáno výše, IL-6 se nejprve nízkoafinitně váže na IL-6R a až poté dochází k vazbě gp130 a k vytvoření vysokoafinitního receptorového komplexu (SCHROERS et al., 2005). Je-li koncentrace IL-6R na cílové buňce nízká, pak dochází k rozpadu komplexu IL-6/IL-6R dříve než mohou být navázány a následně aktivovány receptory gp130.

Také aktivita hmyzích supernatantů obsahujících proteiny Gp67-IL-6, -sIL-6R, -Hyper-IL-6 byla testována na buňkách T2D. Nebyla však jednoznačně prokázána (Obrázek 4.13.). Na vině byla zřejmě obecně nižší účinnost proteinové exprese vlivem použité bakulovirové DNA (Bac Vector - 3000 Triple Cut Virus DNA; Novagen). Virové supernatanty tak nebyly příliš koncentrované a při jejich menším ředění docházelo k cytotoxickému efektu na T2D buňky. Tento efekt byl nejvíce patrný u vzorků s kombinací IL-6 a IL-6R, protože u nich bylo přidáno dvojité množství supernatantů. Bakulovirová exprese proteinů IL-6, sIL-6R a Hyper-IL6 tak bude muset být dále optimalizována.

Dalším cílem do budoucna bude definovat vliv kuřecího Hyper-IL-6 na HSC a TEP buňky a také na neurální kmenové buňky. Již jsme provedly první pilotní experimenty s TEP buňkami, výsledky však v této práci nejsou zahrnuta. Plánujeme také experimenty *in vivo* na kuřecích buňkách za použití retrovirů.

Na základě našich i předchozích publikovaných výsledků se dá shrnout, že Hyper-IL-6 se pomocí aktivace gp130 a dalších intracelulárních signálních molekul podílí na regulaci následujících dějů: Prostřednictvím aktivace MAPK a JAK/STAT podporuje proliferaci buněk a řídí jejich sebeobnovu („self-renewal“; hlavně JAK/STAT) a zabraňuje apoptoze (aktivace PKB). O tom, zda budou buňky pokračovat v sebeobnově své multipotence nebo zda budou naopak diferencovat, rozhodují další faktory, jako jsou SCF, Tpo, Flt-3L nebo Epo, Insulin (Obrázek 5.1.). Spolupůsobení Hyper-IL-6 s těmito faktory je synergické a díky Hyper-IL-6 tedy dochází ke znásobení jejich účinku.

6. Souhrn

Hlavním cílem této diplomové práce bylo připravit rekombinantní kuřecí fúzní protein Hyper-IL-6 a kuřecí proteiny IL-6 a sIL-6R metodami molekulární biologie. Dalšími cíli bylo ověření biologické aktivity těchto proteinů na modelu kuřecí hematopoesy a definování vlivu Hyper-IL-6 na hematopoetické buňky.

Během této diplomové práce bylo dosaženo těchto výsledků:

- V prokaryotickém expresním systému se podařilo připravit a purifikovat rekombinantní protein IL-6.
- V savčím a bakulovirovém expresním systému se podařilo exprimovat rekombinantní proteiny Hyper-IL-6, IL-6 a sIL-6R.
- Podařilo se ověřit a definovat biologickou aktivitu Hyper-IL-6.

Kuřecí protein Hyper-IL-6, který byl získán v rámci této diplomové práce, představuje cenný nástroj pro studium transsignalizace a mechanismů spjatých s aktivací gp130 signální kaskády. Dále Hyper-IL-6 představuje vynikající nástroj pro manipulaci s různými typy kuřecích buněk a jako takový bude použit. Tato diplomová práce přispěla k poznání evoluční konzervovanosti dějů spojených s aktivací receptoru gp130 u savců a ptáků. Aktivace gp130 pomocí Hyper-IL-6 má u obou těchto skupin stejný efekt, kterým je synergické působení společně s dalšími faktory.

Hlavní cíle této diplomové práce byly splněny, některé dílčí experimenty (zejména bakulovirová exprese proteinů, exprese sIL-6R) však budou muset být do budoucna optimalizovány. Přesto byl zadaný diplomní úkol úspěšně vyřešen.

7. Seznam citované literatury

- Abkowitz, J.L., and Chen, J. (2007). Studies of c-Mpl function distinguish the replication of hematopoietic stem cells from the expansion of differentiating clones. *Blood* 109, 5186-5190.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Alexander, W.S. (1999). Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31, 1027-1035.
- Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T., and Heinrich, P.C. (1987). Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS letters* 221, 18-22.
- Audet, J., Miller, C.L., Rose-John, S., Piret, J.M., and Eaves, C.J. (2001). Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1757-1762.
- Auernhammer, C.J., and Melmed, S. (2000). Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev* 21, 313-345.
- Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., *et al.* (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine* 10, 64-71.
- Baron, M.H. (2003). Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Exp Hematol* 31, 1160-1169.
- Bartunek, P., Karafiat, V., Bartunkova, J., Pajer, P., Dvorakova, M., Kralova, J., Zenke, M., and Dvorak, M. (2008). Impact of chicken thrombopoietin and its receptor c-Mpl on hematopoietic cell development. *Exp Hematol* 36, 495-505.
- Bartunek, P., Pajer, P., Karafiat, V., Blendinger, G., Dvorak, M., and Zenke, M. (2002). bFGF signaling and v-Myb cooperate in sustained growth of primitive erythroid progenitors. *Oncogene* 21, 400-410.
- Bartunek, P., Pichlikova, L., Stengl, G., Boehmelt, G., Martin, F.H., Beug, H., Dvorák, M., and Zenke, M. (1996). Avian stem cell factor (SCF): production and characterization of the recombinant His-tagged SCF of chicken and its neutralizing antibody. *Cytokine* 8, 14-20.
- Bazan, J.F. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunology today* 11, 350-354.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology* 340, 783-795.
- Boulanger, M.J., Chow, D.C., Brevnova, E.E., and Garcia, K.C. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science (New York, NY)* 300, 2101-2104.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bravo, J., and Heath, J.K. (2000). Receptor recognition by gp130 cytokines. *The EMBO journal* 19, 2399-2411.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Buzańska, L., Machaj, E.K., Zabłocka, B., Pojda, Z., and Domańska-Janik, K. (2002). Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *Journal of cell science* 115, 2131-2138.
- Corbel, S.Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T.R., Blau, H.M., and Rossi, F.M. (2003). Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nature medicine* 9, 1528-1532.

- Cormier, F., and Dieterlen-Lièvre, F. (1988). The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development (Cambridge, England)* 102, 279-285.
- Corti, S., Locatelli, F., Donadoni, C., Strazzer, S., Salani, S., Del Bo, R., Caccialanza, M., Bresolin, N., Scarlato, G., and Comi, G.P. (2002). Neuroectodermal and microglial differentiation of bone marrow cells in the mouse spinal cord and sensory ganglia. *Journal of neuroscience research* 70, 721-733.
- Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., *et al.* (2004). Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4827-4832.
- Dexter, T.M., and Spooncer, E. (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annual review of cell biology* 3, 423-441.
- Di Campli, C., Piscaglia, A.C., Pierelli, L., Rutella, S., Bonanno, G., Alison, M.R., Mariotti, A., Vecchio, F.M., Nestola, M., Monego, G., *et al.* (2004). A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 36, 603-613.
- Diehl, S., Anguita, J., Hoffmeyer, A., Zapton, T., Ihle, J.N., Fikrig, E., and Rincon, M. (2000). Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 13, 805-815.
- Diehl, S., Chow, C.W., Weiss, L., Palmetshofer, A., Twardzik, T., Rounds, L., Serfling, E., Davis, R.J., Anguita, J., and Rincon, M. (2002). Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *The Journal of experimental medicine* 196, 39-49.
- Dieterlen-Lièvre, F., and Martin, C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Developmental biology* 88, 180-191.
- Dillon, S.R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S.R., Haugen, H.S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., *et al.* (2004). Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nature immunology* 5, 752-760.
- Dolznig, H., Bartunek, P., Nasmyth, K., Mullner, E.W., and Beug, H. (1995). Terminal differentiation of normal chicken erythroid progenitors: shortening of G1 correlates with loss of D-cyclin/cdk4 expression and altered cell size control. *Cell Growth Differ* 6, 1341-1352.
- Elson, G.C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A.B., Delneste, Y., Bonnefoy, J.Y., *et al.* (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nature neuroscience* 3, 867-872.
- Ernst, M., Oates, A., and Dunn, A.R. (1996). Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 271, 30136-30143.
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J.P., Kallen, K.J., Wollmer, A., Grotzinger, J., and Rose-John, S. (1997). I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature biotechnology* 15, 142-145.
- Fujisaki, T., Berger, M.G., Rose-John, S., and Eaves, C.J. (1999). Rapid differentiation of a rare subset of adult human lin(-)CD34(-)CD38(-) cells stimulated by multiple growth factors in vitro. *Blood* 94, 1926-1932.
- Gandrillon, O., Schmidt, U., Beug, H., and Samarut, J. (1999). TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism. *The EMBO journal* 18, 2764-2781.
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., and Baumann, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7251-7255.
- Gekas, C., Dieterlen-Lièvre, F., Orkin, S.H., and Mikkola, H.K. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental cell* 8, 365-375.

- Giraudo, E., Arese, M., Toniatti, C., Strasly, M., Primo, L., Mantovani, A., Ciliberto, G., and Bussolini, F. (1996). IL-6 is an in vitro and in vivo autocrine growth factor for middle T antigen-transformed endothelial cells. *J Immunol* 157, 2618-2623.
- Grace, T.D. (1962). Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* 195, 788-789.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.
- Haan, C., Heinrich, P.C., and Behrmann, I. (2002). Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *The Biochemical journal* 361, 105-111.
- Haan, C., Hermanns, H.M., Heinrich, P.C., and Behrmann, I. (2000). A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *The Biochemical journal* 349, 261-266.
- Hayman, M.J., Meyer, S., Martin, F., Steinlein, P., and Beug, H. (1993). Self-renewal and differentiation of normal avian erythroid progenitor cells: regulatory roles of the TGF alpha/c-ErbB and SCF/c-kit receptors. *Cell* 74, 157-169.
- Hecht, N., Pappo, O., Shouval, D., Rose-John, S., Galun, E., and Axelrod, J.H. (2001). Hyper-IL-6 gene therapy reverses fulminant hepatic failure. *Mol Ther* 3, 683-687.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374, 1-20.
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63, 1149-1157.
- Hirano, T., Matsuda, T., Hosoi, K., Okano, A., Matsui, H., and Kishimoto, T. (1988). Absence of antiviral activity in recombinant B cell stimulatory factor 2 (BSF-2). *Immunology letters* 17, 41-45.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., *et al.* (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-76.
- Hirota, H., Kiyama, H., Kishimoto, T., and Taga, T. (1996). Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *The Journal of experimental medicine* 183, 2627-2634.
- Hložánek, I., Sovová, V. (1968). *Vet Med (Praha)* 13, 468-500.
- Hochuli, E. (1988). Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* 444, 293-302.
- Hooper, N.M., Karran, E.H., and Turner, A.J. (1997). Membrane protein secretases. *The Biochemical journal* 321 (Pt 2), 265-279.
- Houssiau, F.A., Coulie, P.G., Olive, D., and Van Snick, J. (1988). Synergistic activation of human T cells by interleukin 1 and interleukin 6. *European journal of immunology* 18, 653-656.
- Hurst, S.M., Wilkinson, T.S., McLoughlin, R.M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G.M., Topley, N., and Jones, S.A. (2001). IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14, 705-714.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A.K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology* 1, 510-514.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science (New York, NY)* 278, 1803-1805.

- Ikebuchi, K., Wong, G.G., Clark, S.C., Ihle, J.N., Hirai, Y., and Ogawa, M. (1987). Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9035-9039.
- Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., and Goodell, M.A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *The Journal of clinical investigation* 107, 1395-1402.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jones, S.A., and Rose-John, S. (2002). The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochimica et biophysica acta* 1592, 251-263.
- Kucia, M., Halasa, M., Wysoczynski, M., Baskiewicz-Masiuk, M., Moldenhawer, S., Zuba-Surma, E., Czajka, R., Wojakowski, W., Machalinski, B., and Ratajczak, M.Z. (2007). Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia* 21, 297-303.
- Kucia, M., Reca, R., Campbell, F.R., Zuba-Surma, E., Majka, M., Ratajczak, J., and Ratajczak, M.Z. (2006). A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20, 857-869.
- Kudo, O., Sabokbar, A., Pocock, A., Itonaga, I., Fujikawa, Y., and Athanasou, N.A. (2003). Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone* 32, 1-7.
- Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., and Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development (Cambridge, England)* 129, 4891-4899.
- Kunath, T., Saba-El-Leil, M., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development (Cambridge, England)* 134, 2895-2902.
- Lacombe, C., and Mayeux, P. (1998). Biology of erythropoietin. *Haematologica* 83, 724-732.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10626-10631.
- Marz, P., Otten, U., and Rose-John, S. (1999). Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *The European journal of neuroscience* 11, 2995-3004.
- May, L.T., Helfgott, D.C., and Sehgal, P.B. (1986). Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 8957-8961.
- Mihara, M., Moriya, Y., Kishimoto, T., and Ohsugi, Y. (1995). Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. *British journal of rheumatology* 34, 321-325.
- Mullberg, J., Althoff, K., Jostock, T., and Rose-John, S. (2000). The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *European cytokine network* 11, 27-38.
- Murray, P.J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178, 2623-2629.

- Noma, Y., Sideras, P., Naito, T., Bergstedt-Lindquist, S., Azuma, C., Severinson, E., Tanabe, T., Kinashi, T., Matsuda, F., Yaoita, Y., *et al.* (1986). Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. *Nature* 319, 640-646.
- O'Reilly, D., Miller, L.K., and Luckow, V.A. (1992). *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual*. WH Freeman and Company, New York, NY.
- Okada, M., Sakaguchi, N., Yoshimura, N., Hara, H., Shimizu, K., Yoshida, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, S., Yamamura, Y., and Kishimoto, T. (1983). B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* 157, 583-590.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D.M., Leri, A., and Anversa, P. (2003). Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatric transplantation* 7 Suppl 3, 86-88.
- Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2005). The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Developmental cell* 8, 377-387.
- Owczarek, C.M., Layton, M.J., Robb, L.G., Nicola, N.A., and Begley, C.G. (1996). Molecular basis of the soluble and membrane-bound forms of the murine leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain. Expression in normal, gestating, and leukemia inhibitory factor nullizygous mice. *J Biol Chem* 271, 5495-5504.
- Pain, B., Woods, C.M., Saez, J., Flickinger, T., Raines, M., Peyrol, S., Moscovici, C., Moscovici, M.G., Kung, H.J., Jurdic, P., *et al.* (1991). EGF-R as a hemopoietic growth factor receptor: the c-erbB product is present in chicken erythrocytic progenitors and controls their self-renewal. *Cell* 65, 37-46.
- Panzenbock, B., Bartunek, P., Mapara, M.Y., and Zenke, M. (1998). Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* 92, 3658-3668.
- Peri, S., and Pandey, A. (2001). A reassessment of the translation initiation codon in vertebrates. *Trends Genet* 17, 685-687.
- Peters, M., Blinn, G., Jostock, T., Schirmacher, P., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Galle, P.R., and Rose-John, S. (2000). Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* 119, 1663-1671.
- Peters, M., Blinn, G., Solem, F., Fischer, M., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Rose-John, S. (1998). In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol* 161, 3575-3581.
- Peters, M., Schirmacher, P., Goldschmitt, J., Odenthal, M., Peschel, C., Fattori, E., Ciliberto, G., Dienes, H.P., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Rose-John, S. (1997). Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. *The Journal of experimental medicine* 185, 755-766.
- Peters, M., Solem, F., Goldschmidt, J., Schirmacher, P., and Rose-John, S. (2001). Interleukin-6 and the soluble interleukin-6 receptor induce stem cell factor and Flt-3L expression in vivo and in vitro. *Exp Hematol* 29, 146-155.
- Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J.F., Phillips, J.H., McClanahan, T.K., de Waal Malefyt, R., and Kastelein, R.A. (2004). WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172, 2225-2231.
- Pflanz, S., Kurth, I., Grotzinger, J., Heinrich, P.C., and Muller-Newen, G. (2000). Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation. *J Immunol* 165, 7042-7049.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)* 284, 143-147.
- Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E.K., Machalinski, B., and Kucia, M. (2007). Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *Journal of applied genetics* 48, 307-319.

- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., *et al.* (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6, 315-325.
- Rose-John, S., and Heinrich, P.C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *The Biochemical journal* 300 (Pt 2), 281-290.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-135.
- Sanz, E., Hofer, M.J., Unzeta, M., and Campbell, I.L. (2008). Minimal role for STAT1 in interleukin-6 signaling and actions in the murine brain. *Glia* 56, 190-199.
- Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., and Kaziyo, Y. (1988). Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Molecular and cellular biology* 8, 3546-3549.
- Scintu, F., Reali, C., Pillai, R., Badiali, M., Sanna, M.A., Argioli, F., Ristaldi, M.S., and Sogos, V. (2006). Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC neuroscience* 7, 14.
- Schiemann, W.P., and Nathanson, N.M. (1998). Raf-1 independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by leukemia inhibitory factor in 3T3-L1 cells. *Oncogene* 16, 2671-2679.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schneider, K., Klaas, R., Kaspers, B., and Staeheli, P. (2001). Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *European journal of biochemistry / FEBS* 268, 4200-4206.
- Schroeder, C., Gibson, L., Nordstrom, C., and Beug, H. (1993). The estrogen receptor cooperates with the TGF alpha receptor (c-erbB) in regulation of chicken erythroid progenitor self-renewal. *The EMBO journal* 12, 951-960.
- Schroers, A., Hecht, O., Kallen, K.J., Pachta, M., Rose-John, S., and Grotzinger, J. (2005). Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane. *Protein Sci* 14, 783-790.
- Schulze, H., and Shivdasani, R.A. (2005). Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost* 3, 1717-1724.
- Sitnicka, E., Lin, N., Priestley, G.V., Fox, N., Broudy, V.C., Wolf, N.S., and Kaushansky, K. (1996). The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87, 4998-5005.
- Solar, G.P., Kerr, W.G., Zeigler, F.C., Hess, D., Donahue, C., de Sauvage, F.J., and Eaton, D.L. (1998). Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood* 92, 4-10.
- Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., *et al.* (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.
- Stavridis, M.P., Lunn, J.S., Collins, B.J., and Storey, K.G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development (Cambridge, England)* 134, 2889-2894.
- Steinlein, P., Wessely, O., Meyer, S., Deiner, E.M., Hayman, M.J., and Beug, H. (1995). Primary, self-renewing erythroid progenitors develop through activation of both tyrosine kinase and steroid hormone receptors. *Curr Biol* 5, 191-204.
- Stern, C.D. (2005). The chick; a great model system becomes even greater. *Developmental cell* 8, 9-17.
- Stofega, M.R., Wang, H., Ullrich, A., and Carter-Su, C. (1998). Growth hormone regulation of SIRP and SHP-2 tyrosyl phosphorylation and association. *J Biol Chem* 273, 7112-7117.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189, 113-130.
- Sui, X., Tsuji, K., Ebihara, Y., Tanaka, R., Muraoka, K., Yoshida, M., Yamada, K., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., *et al.* (1999). Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor with IL-6 stimulates

megakaryopoiesis from human CD34(+) cells through glycoprotein (gp)130 signaling. *Blood* 93, 2525-2532.

- Sui, X., Tsuji, K., Tanaka, R., Tajima, S., Muraoka, K., Ebihara, Y., Ikebuchi, K., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., *et al.* (1995). gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2859-2863.
- Summers M.D., S., G.E. (1987). *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin 1555.
- Taga, T. (1992). IL6 signalling through IL6 receptor and receptor-associated signal transducer, gp130. *Research in immunology* 143, 737-739.
- Taga, T., and Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual review of immunology* 15, 797-819.
- Tajima, S., Tsuji, K., Ebihara, Y., Sui, X., Tanaka, R., Muraoka, K., Yoshida, M., Yamada, K., Yasukawa, K., Taga, T., *et al.* (1996). Analysis of interleukin 6 receptor and gp130 expressions and proliferative capability of human CD34+ cells. *The Journal of experimental medicine* 184, 1357-1364.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine* 5, 434-438.
- Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T., *et al.* (1993). Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 11924-11928.
- Turner, K.J., Neben, S., Weich, N., Schaub, R.G., and Goldman, S.J. (1996). The role of recombinant interleukin 11 in megakaryocytopoiesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 14 Suppl 1, 53-61.
- Wessely, O., Bauer, A., Quang, C.T., Deiner, E.M., von Lindern, M., Mellitzer, G., Steinlein, P., Ghysdael, J., and Beug, H. (1999). A novel way to induce erythroid progenitor self renewal: cooperation of c-Kit with the erythropoietin receptor. *Biological chemistry* 380, 187-202.
- Wessely, O., Deiner, E.M., Beug, H., and von Lindern, M. (1997). The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *The EMBO journal* 16, 267-280.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.
- Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science (New York, NY)* 241, 825-828.
- Yu, Z., Liu, W., Liu, D., and Fan, L. (2006). The regulatory role of Hyper-IL-6 in the differentiation of myeloid and erythroid progenitors derived from human cord blood. *Cellular immunology* 241, 32-37.

8. Appendix

8.1. Použité primery a oligonukleotidy

Jednotlivé primery a oligonukleotidy použité v této práci byly:

IL-6-1

5' CGGGATCCCCTAGGCCGCTGCCC GCCGCCGCGGACTCGT 3'

BamHI AvrII

IL-6-2

5' GGAAGCTTTCAGGCACTGAAACTCCTGGTCTTTT 3'

HindIII

IL-6R-1

5' CGGGATCCCCCCCCGAGCCCCCCCCACGTTTCC 3'

BamHI

IL-6R-2

5' GCAAGCTTTCAACCGGTCTCAGCAGGGAAGTGCAGCTGTAGAG 3'

HindIII AgeI

LinkerIL-6-1

5' CCGGTAGGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGTGGAGC 3'

AgeI

AvrII

LinkerIL-6-2

5' CTAGGCTCCACGCTTCCTCCTCCGCTTCCTCCTCCCCTA 3'

AvrII

AgeI

pVL-1

5' CCGGATTATTCATACCGTCC 3'

8.2. Homologie

Procentuelní zastoupení homologií (podobných aminokyselin) a identit (totožných aminokyselin) mezi jednotlivými ortology IL-6 a IL-6R (kuře, člověk, myš) jsou uvedeny v Tabulce 8.1. Porovnání jednotlivých sekvencí je znázorněno v Obrázku 8.1.

Tabulka 8.1.

	chIL-6 x huIL-6	chIL-6 x muIL-6		chIL-6R x huIL-6R	chIL-6R x muIL-6R
Identita	38%	31%		39%	35%
Homologie	56%	55%		52%	51%

A Homologie mezi kuřecím, lidským a myším IL-6

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

B Homologie mezi kuřecím, lidským a myším IL-6R

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

50 60 70 80

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

90 100 110 120

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

130 140 150 160

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

170 180 190 200

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

210 220 230 240

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

250 260 270 280

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

290 300 310 320

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

330 340 350 360

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

370 380 390 400

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

410 420 430 440

chIL-6R
huIL-6R
muIL-6R

Obrázek 8.1.

Porovnání aminokyselinových sekvencí kuřecích, myších a lidských proteinů (A) IL-6 a (B) IL-6R. Šedé rámečky označují identity a homologie. Pokud jsou aminokyseliny jednotlivých ortologů identické, je pod ortologními sekvencemi uvedena příslušná aminokyselina. Pokud jsou homologní, je pod sekvencí uvedena tečka.

8.3. DNA sekvence a primární struktura kuřecích IL-6 a IL-6R

DNA kódující sekvence kuřecího IL-6 a IL-6R. Pod DNA sekvencí je uvedena primární aminokyselinová sekvence. Signální peptid je označen žlutě. START kodon a STOP kodon je označen červeně. Na sekvenci IL-6R jsou dále vyznačeny tyto domény a motivy - Ig-like doména (světle modře), FNIII domény (tmavě modře), WSXWS motiv (podtrženo), transmembránová doména (zeleně). DNA sekvence kódující rekombinantní IL-6 a sIL-6R je podtržena.

chIL-6

```

      10      20      30      40      50      60      70
GGCACGAGAG AGAAGCCGCA CCATCAACTT CACCGAGGGC TCGGAGGCGA CGGGACGGCG GCCGGGGAGC
      M N F T E G C E A T G R R P G S>

      80      90      100      110      120      130      140
GCCGGGAGCC GCCGCCGAG AGCGCCCCGT CCCGGCCCCG TCGCGCTGCT GCCGCTGCTG CTGCCGCTGC
      A G S R R R R A P R P G P V A L L P L L L P L>

      150      160      170      180      190      200      210
TGCTGCCGCC CGCCGCCGCC GTCCCGCTGC CCGCCGCCGC GGACTCGTCC GGAGAGGTTG GGCTGGAGGA
      L L P P A A A V P L P A A A D S S G E V G L E E>

      220      230      240      250      260      270      280
GGAGGCGGGG GCGCGGCGGG CGCTGCTCGA CTGCGAGCCG CTGGCCCGGG TGCTGCGCGA CCGCGCCGTC
      E A G A R R A L L D C E P L A R V L R D R A V>

      290      300      310      320      330      340      350
CAGCTGCAGG ACGAGATGTG CAAGAAGTTC ACCGTGTGCG AGAACAGCAT GGAGATGCTC GTCCGGAACA
      Q L Q D E M C K K F T V C E N S M E M L V R N>

      360      370      380      390      400      410      420
ACCTCAACCT GCCCAAGGTG ACGGAGGAGG ACGGCTGCCT GCTCGCCGGC TTCGACGAGG AGAAATGCCT
      N L N L P K V T E E D G C L L A G F D E E K C L>

      430      440      450      460      470      480      490
GACGAAGCTC TCCAGCGGCC TGTTGCGCTT TCAGACCTAC CTGGAATTCA TTCAAGAGAC TTTCGATAGC
      T K L S S G L F A F Q T Y L E F I Q E T F D S>

      500      510      520      530      540      550      560
GAAAAGCAGA ACGTCGAGTC TCTGTGCTAC AGCACAAAGC ACCTGGCGGC CACGATCCGG CAGATGGTGA
      E K Q N V E S L C Y S T K H L A A T I R Q M V>

      570      580      590      600      610      620      630
TAAATCCCGA TGAAGTGGTC ATCCAGACT CGGCCGCCCA GAAATCCCTC CTCGCCAATC TGAAGTCAGA
      I N P D E V V I P D S A A Q K S L L A N L K S D>

      640      650      660      670      680      690      700
TAAGGACTGG ATAGAGAAAA TCACCATGCA CCTCATCTC CGAGACTTTA CTTCGTTTAT GGAGAAGACC
      K D W I E K I T M H L I L R D F T S F M E K T>

      710      720      730      740      750      760      770
GTGAGGGCCG TTCGCTATTT GAAAAAGACC AGGAGTTTCA GTGCCTGAAT GTTTTAGTTC GGGCACAAATC
      V R A V R Y L K K T R S F S A *>

```

chIL-6R

```

      10           20           30           40           50           60           70
GAGTGCACGT GCGGGGCCGC CCCCGCACCG CGTTCCTAAC GCCCGCTTCC GCCGATGCTC CGCTGCCGTC

      80           90          100          110          120          130          140
CGGGGGGGTT CGGAGCTCCG CTCTCCCCC GCGGATGCG CGGCCCCCGG GGCTGTCTCCG CGCCGCGCTG
                               M A R P P G L L R A A L>

     150          160          170          180          190          200          210
CTCCTCCTCA CCGCCGCTC CTCCGCGCCC CGACGCGCT GCGGCCCGT GGCGCTGCCG CAGGACACGG
L L L T A A S S A P R R R C G P V A L P Q D T>

     220          230          240          250          260          270          280
TGCTGGGCCG CCGCGGAGCC AACGTGACGC TGCTGTGCCG GGAACGGGAG CCGCCCAACG GCACCGTGCT
V L G R P G A N V T L L C R E R E P P N G T V L>

     290          300          310          320          330          340          350
GTGCTCTGGG AGGCGGAGGG CGCTGGGGGG GGGCAACGCG CTGCTGCTGG GGGGGCTGCG GCCGGAGGAC
W S G R R R A L G G G N A L L L G G L R P E D>

     360          370          380          390          400          410          420
GCCGGGCGGT ACAGCTGCCA CCTGGGGGGT CACACGCTGC GCACCGTGCG CCTGCTGGTG GAAGAGCCCC
A G R Y S C H L G G H T L R T V R L L V E E D>

     430          440          450          460          470          480          490
CCGAGCCCCC CCACGTTTCC TGCTCCCGGC GCAGCCACGA CAAAGATGTG CTCTGCGAGT GCGCGCCGCG
P E P P H V S C S R R S H D K D V L C E W R P R>

     500          510          520          530          540          550          560
CGCATCGCCG GCTCCGGGCA CGCGAGCGGT GCTATGGATG AAGCGCAGGT TCACAATGGA GAACGCGACG
A S P A P G T R A V L W M K R R F T M E N A T>

     570          580          590          600          610          620          630
GAGCAGCGGT GCCACTTCTA CTCCGCGGCG CAGAAATTCG TCTGCCGGGT GAAGTTCCG CCCGGCACCG
E Q R C H F Y S A A Q K F V C R V K V P P G T>

     640          650          660          670          680          690          700
ACGACACCAA AGCCCTCGTG GTGTCCGTCT GCGTCAGCAG CCGCGCGGGG AGCGCCGCCG CGGAGGACCG
D D T K A L V V S V C V S S R A G S A A A E D R>

     710          720          730          740          750          760          770
CATCTTCACC CTCAATGGCA TCCTGAAGCC GGACCCCCC CTGAACGTGA CGGTGGAGGC AGTGGAGCGT
I F T L N G I L K P D P P L N V T V E A V E R>

     780          790          800          810          820          830          840
TCCCCACAGC GGCTGTGCGT GCGCTGGAGT TACCCCCCT CCTGGGACCC CCGCTTCTAT TGGCTGCGCT
S P Q R L C V R W S Y P P S W D P R F Y W L R>

     850          860          870          880          890          900          910
TCCAGGTGCG CTACCGCCCC GAGCCGGCCC CGAACTTCAC CCAGGTGGAC CAGGTGACGC GGACGTGGTT
F Q V R Y R P E P A P N F T Q V D Q V T R T W L>

     920          930          940          950          960          970          980
GGACATCCGT GATGCCTGGC GTGGCATGCG GCACGTGGTA CAGGTGAGGG CACAGGAGGA GTTTGGGCAC
D I R D A W R G M R H V V Q V R A Q E E F G H>

     990          1000         1010         1020         1030         1040         1050
GGAGCGTGGA GCGAATGGAG CCGGGGAGCG GTGGGCACCC CCTGGACAGA GCCCCGGAT GTCACGGAGA
G A W S E W S R E A V G T P W T E P R D V T E>

    1060         1070         1080         1090         1100         1110         1120
TGGGGCTCTA CAGCTCGCAG TTCCCTGCTG AGGATGATCC CTACGGCTAT GGGGCCACGC TGCCGCCGGA
M G L Y S S Q F P A E D D P Y G Y G A T L P P E>

    1130         1140         1150         1160         1170         1180         1190
GCTCTTTGGT GATGACACTG CTGATGATGC CGGGGGAGCT GTACTGGAGG CCGCCGTCCG CTCCCCACG
L F G D D T A D D A G G A V L E A A V R S P T>

```



```
      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
TCCCCCTACG CCCTCCTGGT GCGGGGGGGC AGTCTGCTGC TGGCCATCAT CCTCTGCTTC GCCATAGGGA
S P Y A L L V A G G S L L L A I I L C F A I G>

      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
TGAGGTACAA ACAGAGGGCA CGGGCACAGC GGGGGGCGAA GCTGGAGGGT GGGGGGCAGC ACCCAATGGT
M R Y K Q R A R A Q R G A K L E G G G Q H P M V>

      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
ACCCCTTTGC CCCCTGGTT CCCCGCTGAG TGCCACCCCC CTGCTGTCGC CCGCTGCCCC CCCCGGGCCT
P L C P P G S P L S A T P L L S P A A P P G P>

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
CTCCATGTCA CCAATTTGGA TTATTTCTC TCGGGAAGT AACTGAGGGG GGGGGGAGCA GTGCTGGCAG
L H V T N L D Y F L S G K *>
```

8.4. Primární aminokyselinové sekvence exprimovaných proteinů

Uvedeny jsou primární aminokyselinové sekvence jednotlivých variant IL-6, IL-6R, Hyper-IL-6. His- varianty proteinů byly exprimovány v *E. Coli*. Varianty HisL- byly exprimovány v savčích buňkách HEK 293 a varianty Gp67- byly exprimovány v hmyzích buňkách. Pod sekvencemi je uvedena kalkulovaná molekulární hmotnost jednotlivých proteinů v kilo daltonech (kDa) a predikovaný isoelektrický bod (pI). Sekvence 6-ti histidinů je označena fialově, gp67 sekreční signál označen tyrkysově, lidský IL-6 sekreční signál označen žlutě.

8.4.1. IL-6

His-IL-6

MASHHHHHHGGSPRPLPAAADSSGEVGLLEEEAGARRALLDCEPLARVLRDRAVQLQDEMCKKFTVCENSMEM
LVRNNLNLPKVTEEDGCLLAGFDEEKCLTKLSSGLFAFQTYLEFIQETFDSEKQNVESLCYSTKHLAATIRQMVINPD
EVIIPDSAAQKSLANLKSDKDWIEKITMHLILRDFTSFMEKTVRAVRYLKKTRSFSA*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 23,47

Odhadované pI = 5.90

HisL-IL-6

MNSFSTSAFGPVAFLGLLLVLPAAFPAPVPPGEHHHHHHGGSPRPLPAAADSSGEVGLLEEEAGARRALLDCEPLA
RVLRDRAVQLQDEMCKKFTVCENSMEMMLVRNNLNLPKVTEEDGCLLAGFDEEKCLTKLSSGLFAFQTYLEFIQET
FDSEKQNVESLCYSTKHLAATIRQMVINPDEVVIIPDSAAQKSLANLKSDKDWIEKITMHLILRDFTSFMEKTVRA
VRYLKKTRSFSA*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 26,50

Odhadované pI = 5.73

Gp67-IL-6

MLLVNQSHQGFGNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSAFAADLGGSPRPLPAAADSSGEVGLLEEEAGARRALLDCEPL
ARVLRDRAVQLQDEMCKKFTVCENSMEMMLVRNNLNLPKVTEEDGCLLAGFDEEKCLTKLSSGLFAFQTYLEFIQE
TFDSEKQNVESLCYSTKHLAATIRQMVINPDEVVIIPDSAAQKSLANLKSDKDWIEKITMHLILRDFTSFMEKTVRA
VRYLKKTRSFSA*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 26,68

Odhadované pI = 5.53

8.4.2. sIL-6R

His-sIL-6R

MASHHHHHHGGSPPEPPHVSCSRRSHDKDVLCEWRPRASPAPGTRAVLWMKRRFTMENATEQRCHFYSAAQ
KFVCRVKVPPGTDDTKALVVSVCVSSRAGSAAAEDRIFTLNGILKPDPLNVTVEAVERSPQRLCVRWSYPPSWD
PRFYWLRQVRYRPEPAPNFTQVDQVTRTWLDIRDAWRGMRHVQVRAQEEFGHGAWSEWSREAVGTPWT
EPRDVTMGLYSSQFPAETG*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 27,09

Odhadované pI = 9.68

HisL-sIL-6R

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEHHHHHHGGSPPEPPHVSCSRRSHDKDVLCEWRPRASPAPG
RAVLWMKRRFTMENATEQRCHFYSAAQKFVCRVKVPPGTDDTKALVVSVCVSSRAGSAAAEDRIFTLNGILKPD
PPLNVTVEAVERSPQRLCVRWSYPPSWDPRFYWLRQVRYRPEPAPNFTQVDQVTRTWLDIRDAWRGMRHV
VQVRAQEEFGHGAWSEWSREAVGTPWTEPRDVTMGLYSSQFPAETG*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 30,13

Odhadované pI = 9.50

Gp67-sIL-6R

MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSAFAADLGGSPPEPPHVSCSRRSHDKDVLCEWRPRASPAPG
TRAVLWMKRRFTMENATEQRCHFYSAAQKFVCRVKVPPGTDDTKALVVSVCVSSRAGSAAAEDRIFTLNGILKPD
DPPLNVTVEAVERSPQRLCVRWSYPPSWDPRFYWLRQVRYRPEPAPNFTQVDQVTRTWLDIRDAWRGMRH
VVQVRAQEEFGHGAWSEWSREAVGTPWTEPRDVTMGLYSSQFPAETG*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 30,31

Odhadované pI = 9.52

8.4.3. Hyper-IL-6

His-Hyper-IL-6

MASHHHHHHGGSPPEPPHVSCSRRSHDKDVLCEWRPRASPAPGTRAVLWMKRRFTMENATEQRCHFYSAAQ
KFVCRVKVPPGTDDTKALVVSVCVSSRAGSAAAEDRIFTLNGILKPDPLNVTVEAVERSPOQLCVRWSYPPSWD
PRFYWLRQVRYRPEPAPNFTQVDQVTRTWLDIRDAWRGMRHVQVQVRAQEEFGHGAWSEWSREAVGTPWT
EPRDVTMGLYSSQFPAETGRGGGGSGGGGSVEPRPLPAAADSSGEVGLLEEAGARRALLDCEPLARVLRDRAV
QLQDEMCKKFTVCENSMEMLRNNLNLPKVTEEDGCLLAGFDEEKCLTKLSSGLFAFQTYLEFIQETFDSEKQNV
ESLCYSTKHLAATIRQMVINPDEVVIPDSAAQKSLANLKSDKDWIEKITMHLILRDFTSFMEKTVRAVRYLKKTRS
FSA*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 50,25

Odhadované pI = 7.54

HisL-Hyper-IL-6

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEHHHHHHGGSPPEPPHVSCSRRSHDKDVLCEWRPRASPAPG
RAVLWMKRRFTMENATEQRCHFYSAAQKFVCRVKVPPGTDDTKALVVSVCVSSRAGSAAAEDRIFTLNGILKPD
PPLNVTVEAVERSPOQLCVRWSYPPSWDPRFYWLRQVRYRPEPAPNFTQVDQVTRTWLDIRDAWRGMRHV
VQVRAQEEFGHGAWSEWSREAVGTPWTEPRDVTMGLYSSQFPAETGRGGGGSGGGGSVEPRPLPAAADSS
GEVGLLEEAGARRALLDCEPLARVLRDRAVQLQDEMCKKFTVCENSMEMLRNNLNLPKVTEEDGCLLAGFDEE
KCLTKLSSGLFAFQTYLEFIQETFDSEKQNVESLCYSTKHLAATIRQMVINPDEVVIPDSAAQKSLANLKSDKDWIE
KITMHLILRDFTSFMEKTVRAVRYLKKTRSFSA*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 53,29

Odhadované pI = 7.05

Gp67-Hyper-IL-6

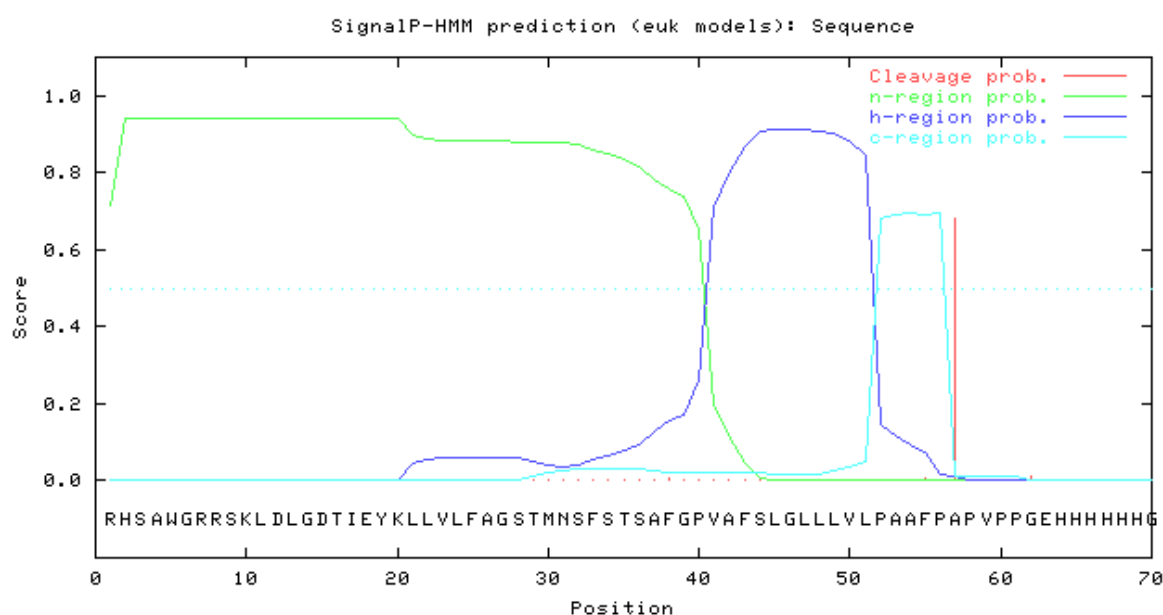
MLLVNQSHQGFKNEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSAFAADLGGSPPEPPHVSCSRRSHDKDVLCEWRPRASPAPG
TRAVLWMKRRFTMENATEQRCHFYSAAQKFVCRVKVPPGTDDTKALVVSVCVSSRAGSAAAEDRIFTLNGILKPD
PPLNVTVEAVERSPOQLCVRWSYPPSWDPRFYWLRQVRYRPEPAPNFTQVDQVTRTWLDIRDAWRGMRHV
VQVRAQEEFGHGAWSEWSREAVGTPWTEPRDVTMGLYSSQFPAETGRGGGGSGGGGSVEPRPLPAAADS
SGEVGLLEEAGARRALLDCEPLARVLRDRAVQLQDEMCKKFTVCENSMEMLRNNLNLPKVTEEDGCLLAGFDEE
EKCLTKLSSGLFAFQTYLEFIQETFDSEKQNVESLCYSTKHLAATIRQMVINPDEVVIPDSAAQKSLANLKSDKDWI
EKITMHLILRDFTSFMEKTVRAVRYLKKTRSFSA*

Kalkulovaná molekulová hmotnost [kDa] = 53,46

Odhadované pI = 7.47

8.5. Predikce lidského IL-6 signálního peptidu

Modifikovaný lidský signální peptid (SP) použitý pro rekombinantní proteiny HisL-IL-6, -IL-6R, -Hyper-IL-6 byl před vlastním klonováním analyzován *in silico* pomocí programu **SignalP 3.0** (BENDTSEN et al., 2004), <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. Bylo tak přesně identifikováno místo štěpení SP a byl predikován potenciálně funkční SP (Obrázek 8.2.).



Obrázek 8.2.

Analýza N-terminální části konstruktů HisL-IL-6, -IL-6R, -Hyper-IL-6. Na obrázku jsou zobrazeny pravděpodobnosti umístění tří míst, ze kterých jsou obvykle tvořeny SP. Jedná se o N-region (zeleně), H-region (tmavě modře) a C-region (světle modře). N-region (N-terminální region) je nezbytný pro směrování proteinu mimo buňku. H-region (Hydrofobní region) je důležitý pro transport proteinu přes membránu. C-region je nezbytný pro štěpení SP. Predikované místo štěpení je označeno červeně.